

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA



***“Estudio de los mecanismos de inmunidad
antifúngica durante la dermatomycosis
experimental con *Microsporum canis*”***

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

Bioq. Verónica Liliana Burstein.

Departamento de Bioquímica Clínica

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

Año 2017

Director de Tesis:

Laura S. Chiapello

Comisión Asesora de Tesis:

Dra. Diana T. Masih

Dra. Alicia Degano

Dr. Fernando Irazoqui

Evaluable externo:

Dr. Pablo C. Baldi

Esta tesis está dedicada a Oscar, Rosita y Bernardo.

Agradecimientos

Quiero agradecer a mi familia y mis amigos que están siempre presentes. Gracias por escucharme, aconsejarme y apoyarme durante estos años en los que mi formación, muchas veces, estuvo por delante de todo. Gracias por recordarme que la vida es un todo y que hay que disfrutarla así. También quiero agradecer a Dai, Leo, Nacho, Vero M., Silvi, Santi y Pilar que siempre fueron mi compañía y mi apoyo durante los años realizando el doctorado. Gracias por las charlas de los almuerzos y en el laboratorio, los “after lab” y los intentos de poder juntarnos todos, la alegría en los momentos lindos y la presencia incondicional en los momentos menos fáciles.

También le agradezco a mi directora Laura por la guía durante estos años de formación.

Tabla de contenidos

Resumen	1
Abstract	2
Abreviaturas	3
Capítulo 1. Introducción	4
1. Las infecciones fúngicas.	5
1.1. Los dermatofitos y las dermatofitosis.	5
1.1.1. <i>Microsporum canis</i> .	7
1.2. Fisiopatología de las dermatofitosis.	8
2. La piel como barrera inmunológica.	11
2.1. Las células de Langerhans.	12
3. Interleuquina 17 y la respuesta mediada por Interleuquina 17.	15
4. Respuesta inmune frente a los dermatofitos.	17
Capítulo 2. Objetivos	19
Capítulo 3. Materiales y métodos	21
3.1. Reactivos.	22
3.2. Medios de cultivo.	22
3.3. Cepa fúngica, condiciones de cultivo y preparación del inóculo para la infección.	23
3.4. Estandarización del inóculo de <i>M. canis</i> .	23
3.5. Animales.	26

3.6. Líneas celulares.	26
3.7. Viabilidad celular.	27
3.8. Cultivos de células XS106 con <i>M. canis</i> .	27
3.9. Co-cultivo de células XS106 con células mononucleares de bazo de ratones alogénicos.	27
3.10. Explantes de epidermis de orejas de ratones.	27
3.11. Obtención de células epidérmicas totales (CEpT) de orejas.	28
3.12. Obtención de células epidérmicas migrantes (CEpM) de orejas.	28
3.13. Purificación de células de Langerhans.	28
3.14. Co-cultivo de células de Langerhans con células mononucleares de bazo de ratones alogénicos.	29
3.15. Modelo de infección epicutánea con <i>M. canis</i> .	29
3.16. Diagnóstico micológico.	30
3.17. Cuantificación de <i>M. canis</i> en tejidos.	30
3.18. Diseminación fúngica a tejidos.	31
3.19. Obtención y cultivo de células epidérmicas de piel del lomo.	31
3.20. Cultivos celulares de células de ganglios linfáticos drenantes de piel.	32
3.21. Extracción de ARN mensajero de epidermis y análisis.	32
3.22. Bloqueo sistémico de IFN- γ en ratones infectados con <i>M. canis</i> .	32
3.23 Depleción de células de Langerhans <i>in vivo</i> en ratones Lang-EGFPDTR.	33

3.24. Análisis estadístico.	33
Capítulo 4: Resultados	34
4.1. Objetivo específico I: Estudiar los efectos de las hifas de <i>M. canis</i> en la activación y maduración de las células de Langerhans y la inducción de la respuesta adaptativa frente a <i>M. canis</i> .	35
4.1.1. <i>M. canis</i> activa a las células XS106 y promueve la diferenciación Th17 en linfocitos alogénicos.	35
4.1.2. <i>M. canis</i> activa a las células de Langerhans en el contexto de la epidermis y genera un ambiente pro-inflamatorio en la piel.	37
4.1.3. Las células de Langerhans pre-activadas con <i>M. canis</i> inducen un perfil Th17 en cultivos alogénicos.	41
Conclusiones de Objetivo Específico I.	43
4.2. Objetivo específico II: Desarrollar un modelo de infección cutánea con <i>M. canis</i> en ratones C57BL/6 y caracterizar la respuesta inmune celular antifúngica.	44
4.2.1. La dermatofitosis experimental con <i>M. canis</i> en ratones C57BL/6 se asemeja a la infección en humanos.	45
4.2.2. La dermatofitosis experimental en ratones C57BL/6 se caracteriza por una respuesta Th17.	48
4.2.3. La señalización por IL-17RA es requerida para controlar la proliferación fúngica y modular la respuesta inflamatoria.	51
4.2.4. Los ratones IL-17RA KO desarrollan una respuesta Th1 durante la dermatofitosis por <i>M. canis</i> .	58

4.2.5. <i>IL-17A controla la infección superficial y la respuesta Th1 en la infección por M. canis.</i>	63
Conclusiones de Objetivo Específico II.	66
4.3. Objetivo Específico III: Determinar el rol <i>in vivo</i> de las células de Langerhans en la respuesta inmune frente a <i>M. canis</i> .	67
4.3.1. <i>Las células de Langerhans contribuyen a la inducción del perfil Th17 durante la dermatofitosis experimental.</i>	67
Conclusiones de Objetivo Específico III.	71
Capítulo 5: Discusión	72
Capítulo 6: Conclusiones	87
Capítulo 7: Perspectivas	90
Capítulo 8: Bibliografía	92
Anexos	112
9.1. Publicaciones	113
9.1.1. Artículos publicados o en prensa	113
9.1.2. Artículos enviados a publicar	113
9.2. Presentaciones en congresos	113
9.3. Premios	114

Resumen

Los dermatofitos son hongos hialohifomicetes, queratinofílicos y patógenos primarios causantes de infecciones superficiales de la piel denominadas dermatofitosis, tiñas o *tineas*. *Microsporum canis* es el agente etiológico más frecuente de *tinea capitis* en la población infantil en Argentina y produce lesiones no inflamatorias o inflamatorias, con diferente grado de compromiso cutáneo dependiendo de la respuesta inmune del hospedador.

La piel es la barrera del organismo con el medio ambiente por lo que la presencia de células de la inmunidad innata y adaptativa es crucial para el correcto desarrollo de una respuesta para resolver un daño, controlar una infección o para mantener la homeostasis del tejido. Las células de Langerhans (LC) son las únicas células dendríticas de la epidermis y podrían tener un rol durante las dermatofitosis. Además, la respuesta mediada por interleuquina 17 (IL-17) es clave en la defensa frente a patógenos extracelulares, como las bacterias y los hongos, y es esencial en la protección de las mucosas. Sin embargo, no se conocen los efectos de los dermatofitos en las funciones de las células dendríticas en el contexto de la piel y la participación de la respuesta mediada por IL-17 en la inmunidad anti-dermatofítica.

El objetivo general de esta tesis fue investigar la respuesta inmune generada luego de la infección de la piel por el dermatofito *M. canis* y evaluar la función de las LC en la inducción de la inmunidad protectora en la dermatofitosis.

En esta tesis, los estudios *in vitro* demostraron que hifas vivas de *M. canis* activan a las células XS106 (línea celular derivada de LC murinas) y a LC localizadas dentro de la epidermis. Además, ambos tipos celulares fueron capaces de inducir un perfil Th17 en cultivos con linfocitos alogénicos.

Por otra parte, se desarrolló un modelo de infección epicutánea con *M. canis* en ratones C57BL/6, los cuales presentaron características clínicas e histopatológicas similares a la *tinea capitis* no inflamatoria en humanos. En este modelo, se demostró que durante la dermatofitosis predomina una respuesta adaptativa antígeno-específica tipo Th17. Además, la señalización de la vía IL-17/IL-17R es necesaria para suprimir la proliferación fúngica en la piel y para controlar la respuesta inflamatoria exacerbada mediada por IFN- γ . Sin embargo, el reclutamiento de neutrófilos en la piel y su funcionalidad es independiente de la señalización por IL-17. A su vez, en ausencia de IL-17 e IFN- γ , se activarían mecanismos protectores eficientes que inhiben la proliferación de *M. canis* en la piel.

Finalmente, mediante la infección con *M. canis* de ratones transgénicos Lang-EGFPDTR depletados de LC, se demostró la participación *in vivo* de las LC en la inducción de la respuesta Th17 específica frente al hongo.

Esta tesis abre diferentes perspectivas de investigación para comprender la inmunidad de la piel en el contexto de la infección dermatofítica.

Abstract

Dermatophytes are hyaline keratinophilic hyphomycetes fungi and primary pathogens that cause skin superficial infections named dermatophytosis, ringworm or *tineas*. *Microsporum canis* is the most prevalent etiological agent of *tinea capitis* during childhood in Argentina and generates non-inflammatory or inflammatory lesions, with different tissue compromise depending on the host immune response.

Skin is the barrier between the body and the environment and the presence of innate and adaptive immune cells is key to a proper development of skin response to resolve an injury, control an infection or maintain tissue homeostasis. Langerhans cells (LC) are the only dendritic cells in epidermis and could have a role in the induction of the immune response in dermatophytosis. Furthermore, interleukin 17 (IL-17)-mediated response is crucial in the defense against extracellular pathogens like bacteria and fungi, and is essential for skin and mucosal protection. However, dermatophyte effects on dendritic cell functions in the skin and IL-17 participation in the anti-dermatophytic response are still unknown.

The principal aim of this thesis was to investigate the immune response generated after skin infection with *M. canis* and to evaluate LC function in the induction of protective immunity against dermatophytes.

In this thesis, *in vitro* studies demonstrated that *M. canis* live hyphae activate XS106 cells (cell line derived from murine LC) and LC localized in epidermis. Also, both cell types were capable of inducing a Th17 response in allogeneic lymphocyte co-cultures.

Meanwhile, an experimental model of epicutaneous infection with *M. canis* was developed in C57BL/6 mice, which presented clinical and histopathological features similar to non-inflammatory human *tinea capitis*. In this model, it was demonstrated that, during dermatophytosis, there is an antigen-specific adaptive Th17 response. Moreover, IL-17/IL-17R signaling is necessary to suppress skin fungal proliferation and to control an exacerbated immune response mediated by IFN- γ . However, neutrophil function and recruitment to skin are independent of IL-17 signalling. Moreover, in IL-17 and IFN- γ absence, there is an activation of efficient protective mechanisms that inhibit *M. canis* proliferation in skin.

Finally, *M. canis* infection in Lang-EGDPDTR transgenic mice depleted of LC demonstrated the *in vivo* LC participation in the induction of the described Th17 specific response.

This thesis unravels different research perspectives to comprehend skin immunity in the dermatophyte infection context.

Abreviaturas

CD207: langerina.

CEpM: células epidérmicas migrantes.

CEpT: células epidérmicas totales.

CLR: Receptor tipo Lectina C.

d.p.i.: días post-infección.

DAMP: Patrón molecular asociado a daño.

DC: células dendríticas.

DCF: diclorofluorescina.

DCF-DA: diclorofluoresceína diacetato.

DETC: Células T dendríticas epidérmicas.

DO: densidad óptica.

EpCAM: molécula de adhesión de células epiteliales asociada al cáncer.

HKMc: heat-killed *M. canis*, suspensión de *M. canis* muerto por calor.

HPLC: cromatografía líquida de alta eficacia.

IFN- γ : interferón gamma.

IL-17: interleuquina 17.

ILC: células linfoides innatas.

LC: células de Langerhans.

M. canis: *Microsporium canis*.

MHC-II: moléculas de tipo II del complejo mayor de histocompatibilidad.

p.i.: post-infección.

PAS: ácido periódico de Schiff.

ROS: especies reactivas del oxígeno.

RPMI: Roswell Park Memorial Institute Medium.

RPMIc: RPMI completo.

TCR: receptor de célula T.

TD: Toxina diftérica.

TGF- β : factor transformador del crecimiento beta.

TNF: factor de necrosis tumoral.

Capítulo 1: Introducción

1. Las infecciones fúngicas

Los hongos son organismos eucariotas que presentan diferentes morfologías y se desarrollan como organismos unicelulares (levaduras) o pluricelulares (hongos filamentosos). Debido a su alta capacidad de adaptación al ambiente en el que se encuentran, los hongos pueden interactuar con plantas, animales y/o humanos y establecer relaciones simbióticas, comensales, latentes o patógenas (Romani 2011). Las especies capaces de generar infecciones en los humanos, pueden ser patógenas primarias u oportunistas y causan infecciones que abarcan invasiones superficiales de la piel y las mucosas, infecciones subcutáneas y micosis profundas que afectan a tejidos vitales (Hohl 2006, LeinbundGut-Landmann 2012).

Dentro de los microorganismos patógenos que afectan al hombre, los hongos pertenecen al grupo menos estudiado. Sin embargo, en los últimos años ha ocurrido un aumento drástico en la incidencia de las infecciones fúngicas, asociado al aumento de la frecuencia de individuos inmunosuprimidos por causas como VIH/SIDA, trasplantes, cáncer, quimioterapia, enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias primarias o individuos sometidos a procedimientos quirúrgicos invasivos (Romani 2004, Romani 2011, Brown 2012, Rouzaud 2016). Además, las infecciones fúngicas que afectan a la piel y mucosas son tan frecuentes que se estima que afectan a cada persona al menos una vez en la vida, con una incidencia global estimada en un 25% (Havlickova 2008, Achterman 2012, Hube 2015). En individuos sanos pueden establecerse como infecciones crónicas y en pacientes inmunosuprimidos evolucionan como formas cutáneas diseminadas, resistentes al tratamiento antifúngico convencional (Vermout 2008a).

1.1. Los dermatofitos y las dermatofitosis

Los dermatofitos son patógenos primarios y los principales causantes de las infecciones superficiales de la piel, afectando tanto a individuos inmunocompetentes como también a pacientes inmunosuprimidos, en los cuales tienen presentaciones atípicas y/o graves (Tirado González 2012). Son hongos filamentosos que infectan a animales mamíferos, dentro de los que se encuentran los humanos. Son organismos altamente especializados y se caracterizan por ser queratinofílicos, por lo que colonizan estructuras queratinizadas como la piel (capa córnea de la epidermis), el pelo y las uñas de humanos como también las garras, piel o plumas de los animales (Weitzman 1995, Brasch 2008).

La cantidad de especies patógenas dentro de este grupo son aproximadamente cuarenta y pertenecen a tres géneros taxonómicos morfológica y fisiológicamente relacionados:

Microsporum sp., *Trichophyton* sp. y *Epidermophyton* sp. Inicialmente, los dermatofitos eran hongos del suelo, pero a lo largo de la evolución se adaptaron a diferentes nichos ecológicos, permitiendo la clasificación en especies geófilas, zoófilas y antropófilas. Generalmente, las micosis por especies antropófilas producen infecciones levemente inflamatorias y/o crónicas mientras que las especies zoófilas, que suelen encontrarse en los animales como gatos, perros, conejos, etc., pueden ser transmitidas a los humanos y pueden causar infecciones inflamatorias que por lo general se auto-resuelven (Brasch 2008, Hay 2016). En el caso de las especies geófilas, están involucradas en la descomposición del suelo por lo que no es muy común que infecten a los humanos y, de ser así, las presentaciones clínicas pueden ser variadas (Achtermann 2013, Havlickova 2008, Hube 2015).

Las dermatofitosis pueden clasificarse de acuerdo con la zona anatómica donde se presenta la infección, de esta manera se denominan *tinea capitis* (dermatofitosis del cuero cabelludo y pelos de la cabeza), *tinea corporis* (cuerpo), *tinea unguium* (uñas), *tinea pedis* (pies), etc. (Hayette 2015). La sintomatología depende de la zona afectada como también de la especie de dermatofito involucrada, la cual puede presentar una predilección por la zona del cuerpo que infectan.

En cuanto a la epidemiología de estas infecciones, ha variado mucho en las últimas décadas y es posible que la prevalencia real sea subestimada (Hayette 2015). Según la Organización Mundial de la Salud, las dermatofitosis tienen una alta prevalencia en la población y se estima que casi todos los humanos van a ser infectados por un dermatofito en algún momento de su vida (Gräser 2008). Además, algunas formas clínicas se presentan con un alto índice de recurrencia luego del tratamiento con antifúngicos (Achtermann 2012) y, aunque raramente están asociadas con mortalidad, son infecciones con una alta morbilidad (White 2008).

Mundialmente, *T. rubrum* es el dermatofito más común mientras que *M. canis* es el dermatofito más predominante en la niñez, con la presentación clínica de *tinea capitis*. (Hay 2016a, Zhan 2017). De manera similar, en nuestra región, se ha reportado una elevada prevalencia de las dermatofitosis (Carballo 2011, Telechea 2011, Spesso 2013) y *M. canis* es el agente etiológico más frecuentemente encontrado en lesiones de *tinea capitis* en la población infantil en Argentina (Mazza 2011, Spesso 2013).

El diagnóstico de las dermatofitosis se basa en la observación directa de las hifas o artroconidias en la muestra clínica (escamas de piel, pelos, uñas o biopsias de tejidos

tratados con KOH 10-40%), el aislamiento y la identificación del hongo en cultivos (Pihet 2017).

1.1.1. *Microsporum canis*

Microsporum canis es un dermatofito zoófilo que coloniza la piel de animales como gatos, perros y cobayos. Debido a que sus huéspedes naturales son animales domésticos, hay una alta transmisión entre animal-humano. Inclusive se han reportado casos de brotes epidémicos en colegios o guarderías, con transmisión entre humanos por contacto directo o a través de elementos fúngicos en el ambiente o en fomites (Bonifaz 2012, Grunwald 2014).

Dentro de los dermatofitos, *Microsporum canis* es una de las especies más prevalentes en el mundo e infecta mayoritariamente a la población infantil causando principalmente *tinea capitis* y también *tinea corporis*. De forma menos frecuente, puede afectar a personas adultas que presenten factores de riesgo asociados, pero las presentaciones clínicas de *tinea capitis* en estos pacientes son atípicas y polimórficas (Bonifaz 2012, Ahmed 2016, Khosravi 2016). *M. canis* tiene la capacidad fisiológica de invadir el folículo piloso por fuera y por dentro del pelo (invasión *ectotrix*) y causar *tinea capitis* no inflamatoria o formas inflamatorias leves o muy supurativas, denominadas *kerion* de Celso (Hay 2016a, John 2016).

En cultivos en agar Sabouraud, este hongo presenta una colonia algodonosa y blanquecina y emite un pigmento amarillo en el reverso (**Figura 1a**). Microscópicamente, *M. canis* presenta hifas hialinas y tabicadas con elementos de fructificación conformados por macroconidias abundantes de aspecto fusiforme y escasas microconidias (**Figura 1b**). En el caso de un examen directo realizado con KOH, solamente se observan hifas hialinas tabicadas (**Figura 1c**).

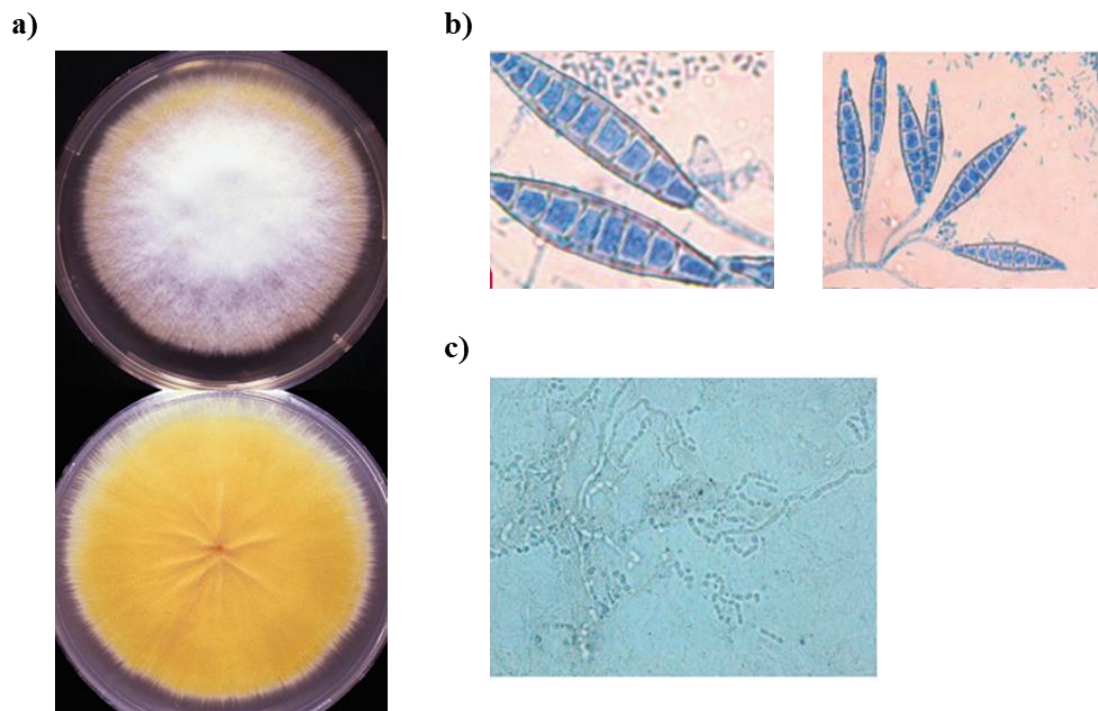


Figura 1. (a) Colonias blancas algodonosas de *M. canis* (anverso) y producción de pigmento amarillo con difusión al medio de agar Sabouraud (reverso). (b) Observación microscópica de microconidias y macroconidias de *M. canis* obtenidas de cultivo en agar Sabouraud. (c) Presencia de hifas hialinas tabicadas en un examen directo con KOH de una escama de piel.

1.2. Fisiopatología de la dermatofitosis

El primer paso necesario para la infección de los dermatofitos es la adherencia de las artrosporas al estrato córneo. Este proceso es rápido, sucede en las horas posteriores al contacto y es mediado, posiblemente, por adhesinas fúngicas que extienden fibrinas que anclan la artroconidias a la superficie del tejido. Luego de 24 horas, las esporas germinan y comienza el desarrollo de la hifa en múltiples direcciones (Duek 2004). Mediante la producción de enzimas proteolíticas, transportadores de sulfuros y secreción de sulfitos, los hongos degradan la queratina y la hifa penetra de forma longitudinal y perpendicular en el estrato córneo, generando un daño marcado en la epidermis (Baldo 2011, Grumbt 2011, Grumbt 2013) (**Figura 2a**). En el caso particular de la *tinea capitis* y de la infección de los pelos, el hongo genera una estructura especializada, a partir de la hifa, que se llama órgano perforador. Esta estructura se observa en el folículo piloso como un área, con disolución de la cutícula y corteza, por donde penetra la hifa (Kanbe 1982, Hay 2006, Hay 2017) (**Figura 2b y c**). Finalmente, las lesiones características de las *tineas* aparecen alrededor de los 10 días.

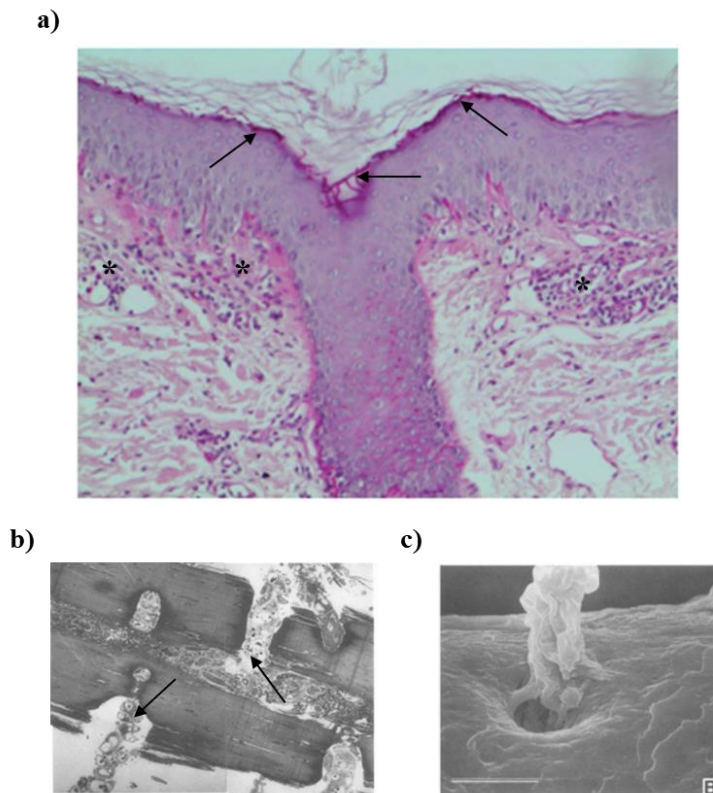


Figura 2. (a) Biopsia de piel de una lesión con presencia de hifas PAS+ (indicado con flechas) en el estrato córneo e infiltrado inflamatorio en la dermis (indicado con asteriscos) (Brasch 2010). (b) Corte longitudinal de un pelo perforado por *Microsporum sp.* (órgano perforador indicado con flecha) (Kanbe 1982). (c) Microscopía electrónica de un pelo con pérdida de cutícula alrededor del órgano perforador (Kanbe 1982).

La tiña de la cabeza por *Microsporum canis* puede tener diferentes presentaciones clínicas: *tinea capitis* no inflamatoria o *tinea capitis* inflamatoria. La forma no inflamatoria se caracteriza por empezar como una pápula eritemato-escamosa que suele aparecer alrededor de un folículo piloso y luego se disemina de forma centrífuga. Son lesiones bien circunscriptas, de aspecto seco y levemente descamativas, en las que el pelo se debilita y puede llegar a presentarse alopecia temporal (**Figura 3a**). Por el contrario, la *tinea capitis* inflamatoria suele comenzar con lesiones secas que evolucionan hacia una *tinea* inflamatoria con lesiones húmedas, placas pustulosas y alopecia. La forma más grave de *tinea capitis* inflamatoria se denomina *kerion* de Celso, con lesiones tipo abscesos profundos con aumento de volumen, dolorosas y con presencia de costras sero-hemáticas melicéricas cubriendo el cuero cabelludo (**Figura 3b, c y d**). El pelo se desprende fácilmente, los folículos pueden encontrarse purulentos y con una respuesta granulomatosa y supurativa, y pueden detectarse linfadenopatías adyacentes. A pesar de

que el *kerion* puede resolverse, sin tratamiento puede causar alopecia definitiva con fibrosis (Stephens 1989, Arenas 2006, Chiapello 2011, Bonifaz 2012, Nenoff 2014, John 2016, Hay 2016). Los micetomas dermatofíticos son formas muy raras de la infección cutánea donde el hongo puede formar granos subcutáneos y lesiones tumorales (**Figura 3e**) (Chiapello 2011).

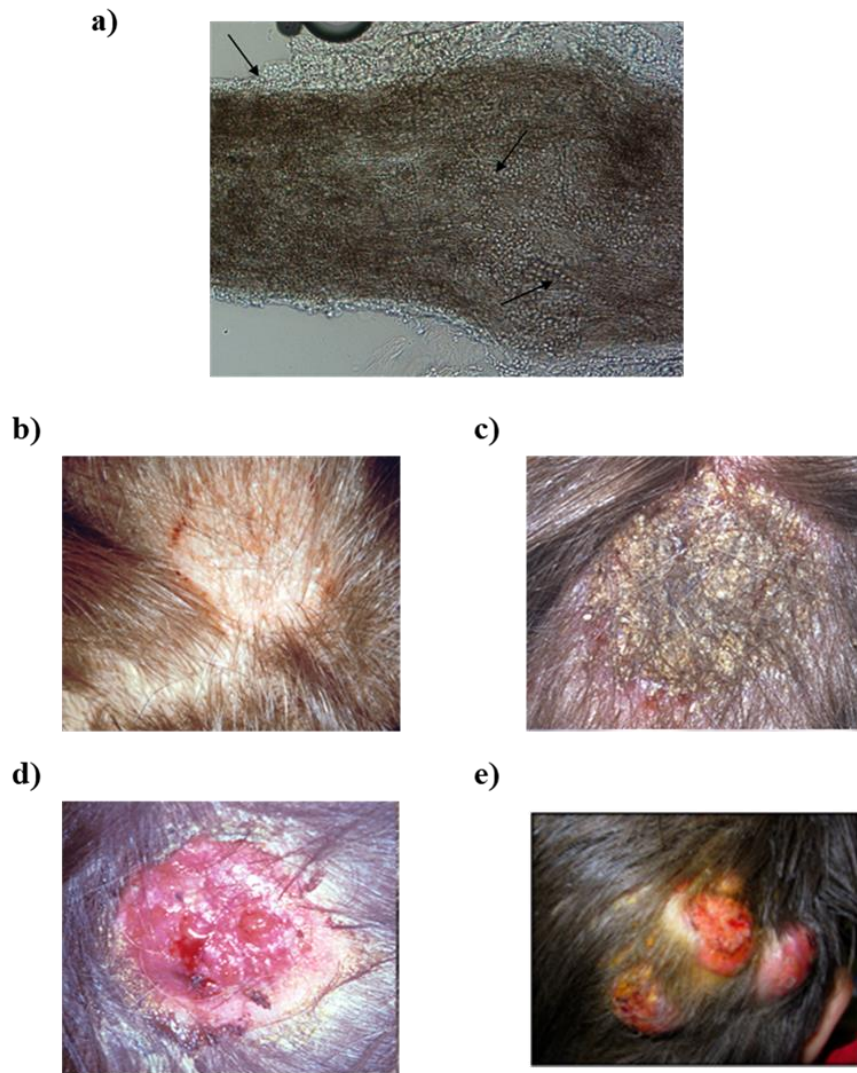


Figura 3. (a) Parasitación ectotrix del pelo por *M. canis*, con artrosporas dentro y fuera del folículo piloso (indicadas con flechas) (Chiapello L.S., no publicada). (b) Presentación seca de *tinea capitis* por *M. canis* (Bonifaz 2012). (c) Presentación inflamatoria de *tinea capitis* por *M. canis* (Bonifaz 2012). (d) Presentación inflamatoria de *tinea capitis* por *M. canis*, tipo *kerion* con presencia de lesiones hemático-serosas (Bonifaz 2012). (e) Presentación clínica inflamatoria rara de *tinea capitis* por *M. canis*, tipo micetoma dermatofítico (Chiapello 2011).

2. La piel como barrera inmunológica

La piel es la barrera del organismo con el medio ambiente, por lo que es la zona más expuesta al medio externo y actúa como defensa de primera línea frente a agresiones químicas y físicas, como también frente a patógenos (Nestle 2009, Belkaid 2016). El sistema inmune residente en la piel es muy dinámico y complejo. Está formado por células de la inmunidad innata y adaptativa cruciales para el correcto desarrollo de una respuesta para resolver un daño, controlar una infección o para mantener la homeostasis del tejido (Roediger 2013). Además, posee una abundante microbiota residente involucrada en la defensa adicional frente a patógenos primarios u oportunistas (Di Meglio 2011, Belkaid 2016).

La epidermis es la capa más externa y se encuentra unida a la membrana basal que la divide de la dermis. Se compone, mayoritariamente, de células epiteliales especializadas denominadas queratinocitos que son fundamentales para el inicio de la defensa cutánea. Estas células se encuentran en diferentes estadios de diferenciación y ordenados en empalizada: estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso y estrato córneo. La capa más externa es la capa córnea, la cual se conforma por queratinocitos muertos, queratina y lípidos hidrofóbicos junto con péptidos antimicrobianos que funcionan como barrera ante el ambiente y potenciales patógenos (Kabashima 2016). El resto de las capas de la piel poseen queratinocitos con receptores de reconocimiento de patrones: receptores tipo toll (TLR), receptores de lectinas tipo C (CLR), receptores NOD (NLR), y receptores tipo RIG-1 (RLR). Estos receptores permiten la detección de patógenos y la inducción de la síntesis de citoquinas, quimiocinas y péptidos antimicrobianos (catelicidinas, defensinas) que modulan localmente el reclutamiento y comportamiento de las células inductoras y efectoras de la inmunidad (Gallo 2012, Mueller 2014). A su vez, también poseen receptores que permiten que estas células respondan frente a citoquinas como TNF, IL-17A e IL-22, entre otras. Entre los queratinocitos, se encuentran otras células como los melanocitos, células de Merkel y poblaciones de células inmunes situadas estratégicamente para la immuno-vigilancia del tejido, tales como las células de Langerhans (LC), las células T dendríticas epidérmicas (DETC) y células T CD8⁺ de memoria. A su vez, también hay apéndices como los folículos pilosos que son estructuras continuas con la epidermis y llegan hasta la dermis (Heath 2013, Kabashima 2016, Kashem 2016).

La dermis, en cambio, está conformada por tejido conectivo con fibroblastos y una matriz extracelular de fibras de colágeno y elastina con una gran variedad de células de la inmunidad. Esta capa de la piel, a diferencia de la epidermis, es vascularizada y hay presencia de diferentes poblaciones de células dendríticas ($CD103^+CD11b^-$ y $CD103^-CD11b^+$), macrófagos, mastocitos, células linfoides innatas, células T gamma-delta, células T $CD4^+$ y $CD8^+$ residentes de memoria, células T regulatorias (Merad 2013, Clausen 2015, Artis 2015). Además, se encuentran las terminales nerviosas que inervan la piel y los vasos linfáticos, por donde las células inmunes migran hacia los ganglios linfáticos (**Figura 4**).

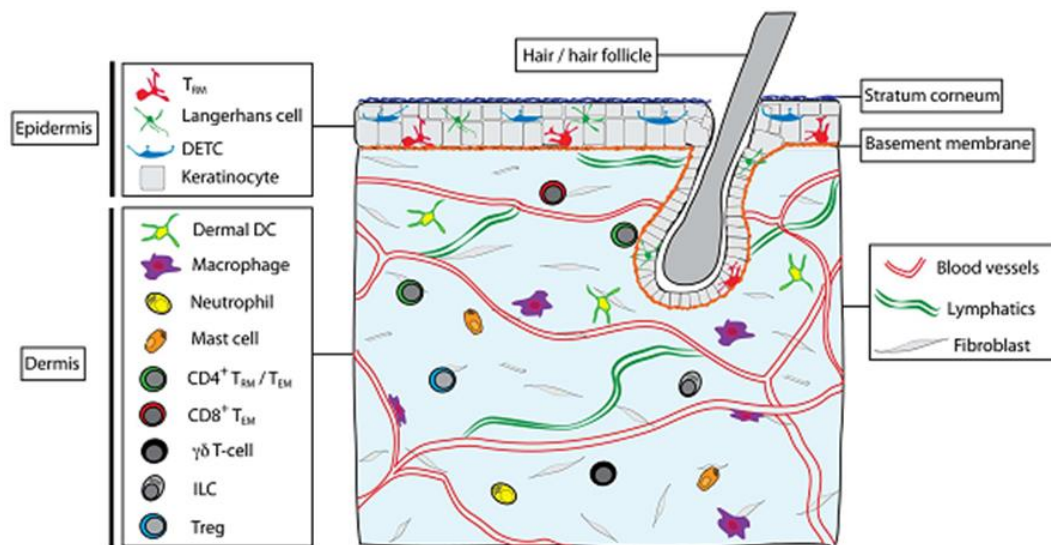


Figura 4. Estructura y células inmunes encontradas en la piel de ratones (Mueller 2014).

En general, existe una gran homología entre la piel humana y la piel murina. Sin embargo, hay algunas diferencias anatómicas e inmunológicas. Por un lado, la piel del ratón se encuentra cubierta de una capa de pelo, mientras que la piel humana tiene pelo más escaso. A su vez, la piel murina es más fina. Con respecto a las células de la inmunidad, se han descrito las contrapartes humanas de las subpoblaciones de células dendríticas dérmicas ($CD103^+$ DDC murinas son las $CD141^+$ DDC humanas y $CD11b^+$ DDC murinas son las $CD1c^+$ DDC humanas) y las células DETC no se encuentran en humanos (Di Meglio 2011, Pasparakis 2014, Belkaid 2016).

2.1. Las células de Langerhans

Las células de Langerhans (LC) son células dendríticas especializadas de la epidermis. En condiciones homeostáticas, son las únicas células presentadoras de antígenos y representan entre un 3-5% de las células epidérmicas (Merad 2008). Estas células

hematopoyéticas están ontogénicamente relacionadas con los macrófagos, se renuevan localmente en la piel y son radio-resistentes. Fenotípicamente, se caracterizan por la expresión de CD45, MHC-II, langerina (CD207), EpCAM, CD11b, CD205, CXCR1 y SIRPα y la presencia de gránulos de Birbeck (Merad 2013, Doebl 2017, Kaplan 2017, Kashem 2017).

Las LC se encuentran localizadas en el estrato granuloso y forman una red entre los queratinocitos y otras células de la epidermis (Mulholland 2006) (**Figura 5a**). Su ubicación y morfología les permite poder extender sus dendritas lateral y verticalmente, por medio de las uniones estrechas del epitelio y los queratinocitos, hacia el estrato córneo y sensor la parte exterior de la piel sin romper la integridad de la epidermis (Nishibu 2006, Kubo 2009, Gaiser 2012, Kabashima 2016) (**Figura 5b y c**).

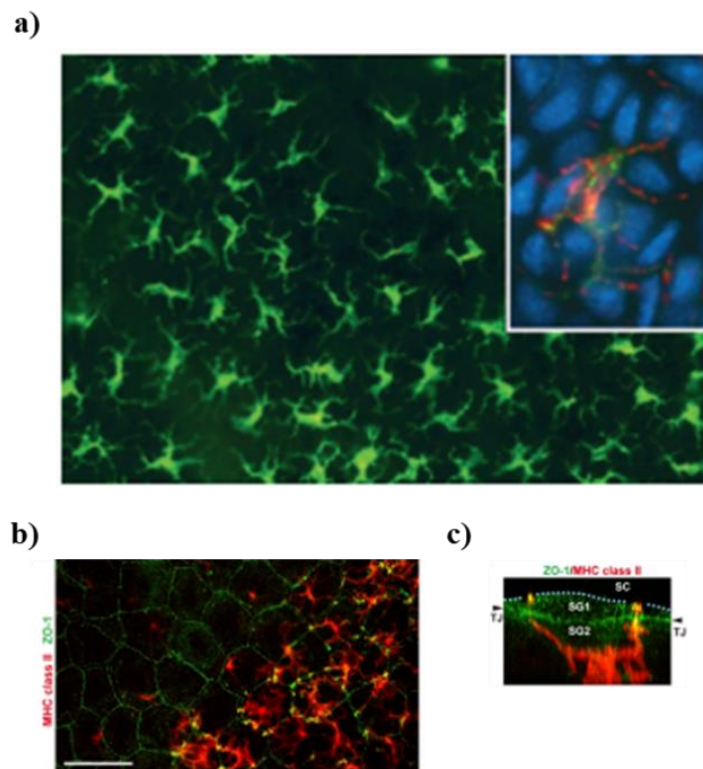


Figura 5. (a) Células de Langerhans (MHC-II⁺ EGFP⁺) en hoja de epidermis de piel de ratones. Inserto con doble marcación de células de Langerhans con MHC-II (fluorescencia verde) y langerina (fluorescencia roja) y contra tinción con DAPI (fluorescencia azul) (Romani 2010). (b) Células de Langerhans (MHC-II⁺, fluorescencia roja) activadas exhiben mayor fluorescencia que las LC sin activar (Kubo 2009). (c) Dendritas de células de Langerhans penetrando las uniones estrechas de la epidermis (Kubo 2009).

Las LC tienen una función dual en la piel ya que están involucradas en la generación de tolerancia inmunológica y en la inducción de la respuesta inmune. En condiciones

basales, estas células constantemente migran a los ganglios linfáticos drenantes de piel, donde presentan antígenos epidérmicos a los linfocitos T para inducir anergia y promover la tolerancia periférica (Lutz 2010, Shklovskaya 2011). En cambio, cuando entran en contacto con un patógeno, las LC tienen cambios fenotípicos que indican su activación (aumentan la expresión de MHC-I y II y las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86, CD40, disminuyen la expresión de langerina y de E-cadherina) y migran desde la epidermis, a través de la dermis, hacia los ganglios linfáticos drenantes de piel donde son responsables de presentar los antígenos y direccionar la respuesta inmune adaptativa (de Jong 2010).

En modelos de infecciones experimentales en ratón, se ha observado que las LC pueden inducir diferentes tipos de respuestas en los linfocitos T vírgenes por lo que se ha considerado que las respuestas inmunes inducidas por las LC son versátiles y dependen del patógeno y las señales del microambiente, y no tanto de una especialización funcional como sucede con las células dendríticas convencionales (Schlitzer 2014). En el caso de la infección cutánea con la levadura oportunista *Candida albicans*, las LC inducen un perfil Th17 dependiente de la producción de IL-6 (Igyartó 2011, Kashem 2015) y las LC también inducen respuestas de tipo IL-17 por células T $\alpha\beta$ y células T $\gamma\delta$ frente a la bacteria *Staphylococcus aureus* (Kobayashi 2015). Sin embargo, en leishmaniasis cutánea, las LC inducen una expansión de las células T regulatorias que suprimen la respuesta Th1 protectora favoreciendo la infección parasitaria (Katz-Neu 2011). Aunque las LC son requeridas para las respuestas en las que el antígeno se encuentra en la epidermis, pueden tener funciones redundantes con algunas subpoblaciones de células dendríticas dérmicas (Kaplan 2017).

Sólo dos trabajos se han publicado referidos a las LC en dermatofitosis. En la década de 1980, Braathen y Kaaman (Braathen 1983) describieron, en experimentos *in vitro*, que células de Langerhans humanas (células epidérmicas HLA-DR⁺) estimulan la proliferación de linfocitos, aislados de pacientes con dermatofitosis, frente a tricotina, un antígeno de *T. rubrum*. Posteriormente, se observó que las LC se acumulan en el sitio de lesión de la *tinea corporis* (Brasch 1993). Estos estudios, y el hecho que los dermatofitos invaden el estrato córneo y se mantienen en la epidermis, sugieren que las LC serían importantes en la inmunidad anti-dermatofítica. Sin embargo, todavía no se ha estudiado el rol de las LC en la inducción de la respuesta antifúngica en estas micosis (Heinen 2017).

3. Interleuquina 17 y la respuesta mediada por Interleuquina 17

La interleuquina 17 (IL-17) es una citoquina inflamatoria clave en la defensa frente a patógenos extracelulares, como las bacterias y los hongos, y es esencial en la protección de las mucosas (Pappu 2012).

La familia de IL-17 comprende seis proteínas con una alta homología estructural: IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (o IL-25) (**Figura 6**). Estas seis proteínas componen homodímeros, aunque IL-17A e IL-17F pueden ser secretadas, además, como heterodímeros IL-17AF. Estas citoquinas señalizan a través de una familia de receptores diméricos: IL-17RA, IL-17RB, IL-17RC, IL-17RD, IL-17RE, siendo la subunidad A un requisito para la señalización de IL-17A, IL-17C, IL-17E e IL-17F (**Figura 6**). Estos receptores actúan activando una vía de señalización intracelular mediada por Act1 que involucra MAP quinasas y NF- κ B. La expresión diferencial de determinados receptores y citoquinas en diferentes células y tejidos determina la diversidad funcional y la participación en la respuesta inmune (Gaffen 2009, Iwakura 2011, Pappu 2012, Song 2013a). IL-17A e IL-17F han sido asociadas a respuestas antifúngicas y antibacterianas, mientras que IL-17E participa en la respuesta antiparasitaria e IL-17C en la regulación de la inmunidad epitelial. IL-17B e IL-17D son las menos estudiadas, aunque estarían relacionadas con efectos pro-inflamatorios (Pappu 2012, Song 2013a).

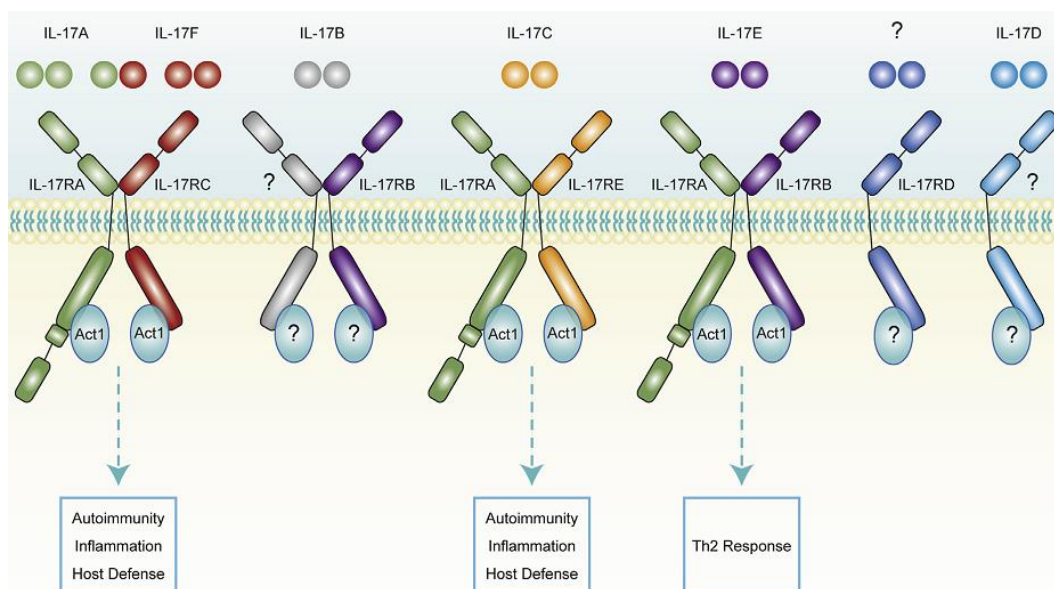


Figura 6. Familia de citoquinas de IL-17 y receptores (Song 2013).

La respuesta mediada por IL-17 se considera como una interfase entre la respuesta inmune innata y adaptativa. Las células innatas como las células T $\gamma\delta$, células T asesinas naturales

(NKT), células asesinas naturales (NK) y células innatas linfoides tipo 3 (ILC3) expresan IL-17 al ser inducidas por productos derivados de patógenos o citoquinas como IL-1 β o IL-23 (Song 2013, Veldhoen 2017). También se ha reportado la producción de IL-17 por monocitos, neutrófilos, células linfoides inductoras de tejido (LTi) y linfocitos B (Cua 2010). En el caso de la inmunidad adaptativa, la polarización a linfocitos Th17 es inducida por la combinación de IL-6 y TGF- β , aunque las citoquinas requeridas son dependientes del microambiente del tejido (Hu 2011). Además, el linaje de linfocitos Th17 se caracteriza por la expresión de los factores de transcripción ROR γ t y STAT3 (Espinosa 2012) y es dependiente de IL-23 para el mantenimiento *in vivo* (McGeachy 2009). También se ha reportado que las células T CD8⁺ pueden producir IL-17 y se denominan Tc17 (Nanjappa 2012).

La IL-17A es la citoquina más característica de la familia de IL-17 y a la que se le otorgan la mayoría de las funciones reportadas. Los mecanismos efectores de IL-17A son pleiotrópicos y tienen el objetivo de defender las barreras epiteliales de la invasión de patógenos. Principalmente, IL-17A induce la expresión de citoquinas inflamatorias como IL-1, IL-6, y TNF, aumenta la expresión de quimiocinas que atraen neutrófilos y monocitos como también otras células inmunes productoras de IL-17, induce la producción de péptidos antimicrobianos (como β -defensinas y catelicidinas) por células epiteliales, incrementa la inducción de metaloproteasas que favorecen el reclutamiento de células inmunes a través de la matriz extracelular, estimula la producción de ciclooxigenasa 2 (COX-2) que produce prostaglandina E2 (PGE2) y favorece la vasodilatación e induce la expresión de G-CSF y GM-CSF que median la expansión y supervivencia de células polimorfonucleares (van der Berg 2013, Amatya 2017, Veldhoen 2017). Además, IL-17 puede actuar, de forma aditiva o en sinergia, con otras citoquinas pro-inflamatorias como TNF o IL-22 y potenciar la respuesta en el tejido (van der Berg 2013).

En modelos experimentales en ratones, como también en humanos, se ha reportado que las deficiencias en el eje IL-17/IL-17R están relacionadas con una alta susceptibilidad a infecciones bacterianas y fúngicas (Hirota 2012). A su vez, pacientes con fallas en las vías de señalización de receptores de reconocimiento de patógenos que inducen Th17 presentan una mayor susceptibilidad a infecciones por dermatofitos y *Candida sp.*, lo cual sugiere un rol no redundante de la respuesta mediada por IL-17 en las infecciones fúngicas mucocutáneas (Lanternier 2013, Gladiator 2013).

Sin embargo, todavía no se ha estudiado particularmente la función de la respuesta mediada por IL-17 en las infecciones de la piel por dermatofitos y no hay evidencias experimentales directas de su participación en la protección frente a estos hongos (Heinen 2017).

4. Respuesta inmune frente a los dermatofitos

Cuando un dermatofito toma contacto con el tejido cutáneo, hay mecanismos antimicrobianos no inmunológicos que actúan tempranamente como los ácidos grasos del sebo o la presencia de transferrina, péptidos antimicrobianos o microflora que interfieren en el crecimiento del hongo (Brasch 2010). Concomitantemente, se activan mecanismos inmunológicos innatos frente a los dermatofitos: los queratinocitos aumentan la expresión de los péptidos antimicrobianos (como β -defensina 2 o RNAsa 7), incrementan la proliferación celular para inducir la descamación del tejido y la eliminación del hongo, y producen citoquinas pro-inflamatorias (como IL-8) y quimiocinas que son quimiotácticas de neutrófilos y macrófagos (Brasch 2010). Estudios *in vitro* demuestran que neutrófilos humanos se unen a las conidias y a las hifas de dermatofitos y disminuyen la viabilidad del hongo por fagocitosis, derivados tóxicos del oxígeno o formación de trampas extracelulares (Calderón 1987, Calderón 1987a, Heddergott 2012). Además, Cambier *et al.* demostró que neutrófilos felinos aumentan el ARN mensajero de TLR-2 y TLR-4 y producen citoquinas como TNF, IL-1 β e IL-8 frente al estímulo con artroconidias vivas de *M. canis* (Cambier 2013). Por lo tanto, los neutrófilos estarían involucrados en la eliminación del hongo como también en el reclutamiento de otras células inmunes al tejido (Cambier 2013, Cambier 2017). Todos estos mecanismos innatos en el tejido llevan a un estado altamente pro-inflamatorio con daño en la barrera epidérmica e infiltración de las células fagocíticas (Almeida 2008, Mignon 2008, Brasch 2009).

En cuanto a la respuesta inmune adaptativa, se conoce que la inmunidad mediada por células T es necesaria para la recuperación clínica y la protección en la dermatofitosis humana y en modelos experimentales en cobayos y ratones (Rasmussen 1978, Hay 1983, Koga 2005, Jensen 2007, Vermout 2008, Brasch 2009, Fritz 2012, Cambier 2014). Pacientes con defectos en la respuesta mediada por linfocitos T CD4⁺, tales como los pacientes con VIH/SIDA o con leucemias, son muy susceptibles a las dermatofitosis presentando infecciones cutáneas diseminadas y/o recurrentes (Gupta 2000, Johnson 2000, Smith 2001, Nnoruka 2007, Sawada 2012). En un modelo de dermatofitosis

experimental en ratones con el patógeno murino *Trichophyton quinckeanum*, se reportó la inducción de una respuesta antígeno-específica de linfocitos T CD4⁺ durante la infección. Estos linfocitos, al ser transferidos adoptivamente a un ratón irradiado, generaban protección frente a la infección primaria o frente a una reinfección (Hay 1983, Calderón 1984, Hay 2017). Además, en lesiones en humanos se demostró la presencia de linfocitos T CD4⁺ y T CD8⁺ que infiltran la piel en proximidad a la lesión dermatofítica (Brasch 1993, Koga 2001). Coincidentemente, se detectaron células productoras de IFN- γ en lesiones de *tinea corporis* y producción de esta citoquina en células mononucleares de sangre periférica de pacientes con dermatofitosis, luego de un estímulo antígeno-específico (Koga 1993, Koga 2001, Koga 2001a, Bressani 2013). Estas evidencias sugerían que la respuesta adaptativa de tipo T helper 1 (Th1) es importante para la resolución de la dermatofitosis (Brasch 2009, Hay 2016). Sin embargo, es importante destacar que la mayoría de los estudios de la respuesta inmune en dermatofitosis han sido realizados previo al descubrimiento de la respuesta T helper 17 (Th17) (Veldhoen 2017). En un trabajo reciente, se ha descrito una sobre-expresión de ARNm de IL-1 β , IL-6 y TGF- β en lesiones de piel en un modelo de dermatofitosis murina con los dermatofitos *Arthroderma benhamiae* y *Arthroderma vanbreuseghemii*, lo cual sugiere una posible inducción de un perfil Th17 (Cambier 2014). Sin embargo, hasta ahora no se ha demostrado cuál es el perfil de inmunidad adaptativa antígeno-específica (Th1, Th17, Th2, etc.) que predomina en las dermatofitosis y no hay estudios que demuestren directamente la función de la respuesta dependiente de IL-17 en estas infecciones (Heinen 2017). Por otra parte, algunos estudios sugieren que las células dendríticas epidérmicas, las células de Langerhans, inducen la inmunidad celular anti-dermatofítica (Braathen 1983) y se acumulan en la zona de infección, lo cual se podría relacionar con su función como célula presentadora de antígenos (Szepes 1993, Brasch 1993, Koga 2005). Por lo tanto, es necesario profundizar en el conocimiento de los mecanismos precisos de la respuesta inmune innata y adaptativa durante las dermatofitosis.

Capítulo 2: Objetivos

El objetivo general de esta tesis fue caracterizar la respuesta inmune protectora en la dermatofitosis experimental por *Microsporium canis* y evaluar la función de las células de Langerhans en la inducción de la inmunidad antifúngica.

Los objetivos específicos son:

- **Objetivo específico I:** Estudiar los efectos de las hifas de *M. canis* en la activación y maduración de las células de Langerhans y la inducción de la respuesta adaptativa frente a *M. canis*.
- **Objetivo específico II:** Desarrollar un modelo de infección cutánea con *M. canis* en ratones C57BL/6 y caracterizar la respuesta inmune celular antifúngica.
- **Objetivo específico III:** Determinar el rol *in vivo* de las células de Langerhans en la respuesta adaptativa frente a *M. canis*.

Capítulo 3: Materiales y métodos

3.1. Reactivos.

Los cultivos celulares fueron realizados en medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (SFB), L-glutamina, Gentamicina, PenStrep[®], buffer HEPES, Piruvato de sodio y Solución de Aminoácidos No Esenciales (MEM-NEAA) (obtenidos de Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) y 2-mercaptoetanol, obtenido de Merck (Alemania).

Para la estimulación celular inespecífica en cultivo se utilizó PMA e Ionomicina (Sigma-Aldrich, Alemania). Para la detección de citoquinas intracelulares se utilizó GolgiPlug[®] (Brefeldina A) de BD Biosciences (Estados Unidos).

Para experimentos con citometría de flujo se utilizaron los anticuerpos superficiales anti-FcR (anti-mouse CD16/CD32, Fc Block[®]), anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-Ly6G, anti-CD11b, anti-Gr-1, anti-IA/IE, anti-CD45, anti-CD40, anti-CD80, anti-CD86 marcados con diferentes fluorocromos (BD). Los anticuerpos para detección de citoquinas intracelulares anti-IL17A y anti-IFN- γ fueron obtenidos de BD Biosciences (Estados Unidos) y de EBioscience (Estados Unidos). Para la fijación y permeabilización de las células se utilizó Cytofix/Cytoperm y Perm Wash (BD Biosciences). En los experimentos de medición de especies reactivas del oxígeno en epidermis, se utilizó una sonda fluorescente de 2', 7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) (Fujita 2014), obtenida de Sigma-Aldrich (Alemania).

Los kits para la detección de citoquinas por ELISA de IL-12p70, IL-6, IL-10, TNF e IFN- γ fueron adquiridos de BD Biosciences (Estados Unidos) y para la detección de IL-17A e IL-23 de EBioscience (Estados Unidos).

Las enzimas para el procesamiento de piel, Dispasa II y Colagenasa D fueron obtenidas de Roche (Suiza), Tripsina fue obtenida de Sigma-Aldrich (Alemania), EDTA fue obtenido de Cicarelli (Argentina).

Para la purificación de las células de Langerhans, Epidermal Langerhans Cells Microbead kit fue adquirido de Miltenyi Biotec (Alemania).

3.2. Medios de cultivo.

En todos los cultivos celulares, salvo que se indique, se utilizó RPMI completo (RPMIc). El mismo está compuesto por RPMI 1640, suero fetal bovino (10%), L-glutamina (2 mM), buffer HEPES (25mM), Piruvato de sodio (10 μ M) y Solución de Aminoácidos No Esenciales (MEM-NEAA, 100 μ M), 2-mercaptoetanol (50 μ M), Gentamicina y PenStrep (50 μ g/ml).

3.3. Cepa fúngica, condiciones de cultivo y preparación de inóculo para la infección.

La cepa clínica de *Microsporum canis* (*M. canis*, UNCMc01, Universidad Nacional de Córdoba) fue originalmente aislada de un paciente con *tinea capitis* (Chiapello 2011) y mantenida en agar Sabouraud glucosado (Britannia, Argentina), con o sin cicloheximida. Con el fin de que el hongo sea metabólicamente activo, las suspensiones de *M. canis* se han utilizado dentro de los 15 días de cultivo obtenido mediante sucesivos repiques, cultivos del cepario en agua o retrocultivos provenientes de animales infectados.

3.4. Estandarización del inóculo de *M. canis*.

Teniendo en cuenta que los dermatofitos son hongos filamentosos, lo cual hace difícil la cuantificación de las estructuras fúngicas y, por lo tanto, el establecimiento de una concentración de inóculo reproducible, fue necesario estandarizar la cantidad de hongo para utilizar en los ensayos *in vitro* y para el modelo de infección epicutánea.

La concentración de una suspensión de un hongo filamentoso puede determinarse como peso de micelio por volumen en una suspensión y/o por medida de la turbidez como densidad óptica (DO) a 450 nm, entre otras (Pujol 1996). En este sentido, diferentes concentraciones deben tener diferencias en la turbidez. Al inicio de esta tesis, las preparaciones de hifas de *M. canis* se realizaron a partir del cultivo de la cepa UNCMc01 en RPMI 1640 en agitación a 28°C durante 5 días. Posteriormente, los micelios fueron lavados con agua estéril y se liofilizó el hongo para poder pesarlo y generar suspensiones de diferentes concentraciones (peso de micelio/volumen de solución fisiológica). Sin embargo, las suspensiones obtenidas no fueron homogéneas y, como se detalla en la **Tabla 1**, las diferentes concentraciones (de acuerdo con la relación peso/volumen) no presentaron diferencias en la turbidez medida como densidad óptica a 450 nm. Se concluyó que la re-suspensión de hifas luego de la liofilización, no es un buen método para preparar las suspensiones de *M. canis*.

<i>Microsporium canis</i>			
Concentración	DO	DO promedio	SD
1 mg/ml	0,068	0,073333333	0,006
	0,072		
	0,08		
10 mg/ml	0,061	0,064333333	0,008
	0,059		
	0,073		
50 mg/ml	0,063	0,072	0,012
	0,085		
	0,068		
100 mg/ml	0,082	0,075	0,077
	0,075		
	0,075		

Tabla 1. Densidades ópticas medidas a 450 nm de soluciones de UNCMc01 a diferente concentración determinadas por la relación peso de micelio/volumen: 1 mg/ml, 10 mg/ml, 50 mg/ml y 100 mg/ml.

Por lo tanto, se estandarizaron las suspensiones de hongo partiendo de una suspensión de DO 0,2 y realizando diluciones 1/10 y 1/100. Como se observa en la **Figura 7a**, las diferentes diluciones se correlacionaron con la DO a 450 nm y, a su vez, la DO se correlacionó con la producción de unidades formadoras de colonias (UFC) (**Figura 7b y c**). Considerando estos resultados, se decidió utilizar la DO como medida de concentración de la suspensión fúngica. La **Figura 7c** muestra que la DO 0,08 (dilución 1:10) produjo 4.280 ± 21 UFC/ml, luego del cultivo en placas de agar Sabouraud, y no alteró la viabilidad de las células XS106 luego de 48 hs. de cultivo (**Figura 7d**).

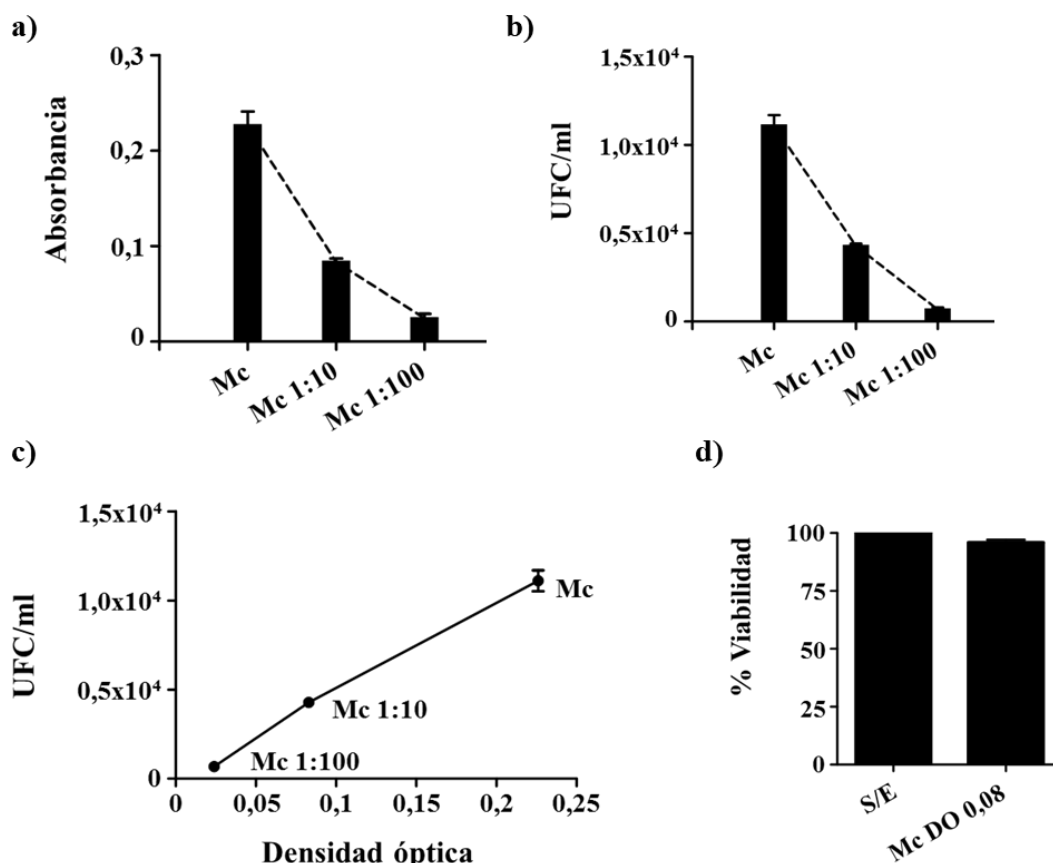


Figura 7. (a) Absorbancia de suspensiones de *M. canis* a diferentes diluciones. (b) Unidades formadoras de colonia (UFC) en agar Sabouraud de 1 ml de suspensión de *M. canis* en diferentes diluciones. (c) Correlación de la densidad óptica con la generación de UFC. (d) Viabilidad medida con el ensayo de MTT en células XS106 sin estímulo (S/E) o cultivadas con *M. canis* (DO 0,08) por 48 hs.

De acuerdo con estos resultados, la preparación del inóculo fúngico se estandarizó de la siguiente manera:

Para la preparación de la suspensión de *M. canis*, la cepa UNCMc01 fue obtenida luego de cultivos de 10-15 días en picos de flauta de agar Sabouraud con cicloheximida. Se colocaron 3 a 4 ml de solución fisiológica en el tubo de pico de flauta y la superficie del micelio se raspó con un ansa, posteriormente la suspensión del hongo fue filtrada por una malla metálica. La concentración fue determinada por densidad óptica (DO) a 450 nm en espectrofotómetro y por unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml) con ensayos de dilución en placa.

Para los experimentos *in vitro*, se utilizó una suspensión con una DO=0,08 (aproximadamente 4000 UFC/ml) mientras que para los experimentos *in vivo*, se utilizó una suspensión de *M. canis* con una DO=0,2 (aproximadamente 11.100 UFC/ml). Para

generar la suspensión de HKMc (heat-killed *Microsporium canis*, *M. canis* muerto por calor) utilizada como estímulo antígeno-específico en los cultivos celulares, la suspensión de DO=0,08 fue incubada por 1 hora a 60°C y utilizada en el momento.

3.5. Animales.

Las cepas C57BL/6 y BALB/c fueron compradas a la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Las cepas modificadas genéticamente tienen un background C57BL/6 y han sido amablemente provistas por diferentes investigadores. La cepa IL17RA^{-/-} por Amgen Inc. (MTA N° 2015647778, Estados Unidos), la cepa IL17AF^{-/-} por el Dr. Prinz (Hannover Medical School, Alemania) y la cepa Lang-EGFPDTR por el Dr. Malissen (INSERM, Francia). Todas las cepas han sido mantenidas en el Bioterio de la CIBICI-CONICET de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, bajo las guías de Cuidado y Uso de Animales Experimentales publicada por el Consejo Canadiense de Cuidados Animales (A5802-01). A su vez, todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Ética de Protocolos Experimentales en el uso de animales en los proyectos científicos (Res. 908/2015) y realizados dentro de las instalaciones del Bioterio.

3.6. Líneas celulares.

Las líneas celulares XS106 y NS47 fueron provistas por el Dr. Takashima (University of Toledo, Ohio, Estados Unidos). La línea celular J558-GM-CSF fue provista por la Dra. Cervi (Universidad Nacional de Córdoba).

Las células XS106 son una línea celular de células dendríticas establecida de la epidermis de ratones A/J. Poseen un fenotipo maduro caracterizado por Ia⁺, CD80⁺, CD86⁺ y exhiben una capacidad para activar inmunológicamente células T vírgenes en una reacción linfocitaria alogénica mixta. Esta línea celular es fenotípicamente (MCH-II⁺/CD45⁺/CD16⁺/E-cadherina⁺/CD207⁺) y funcionalmente similar a las células de Langerhans murinas (Timares 1998, Takashima 2001). Las células NS47 son una línea celular de estroma, establecida de la epidermis de ratones BALB/c recién nacidos, que se utiliza para generar el sobrenadante NS47 como suplemento del medio para cultivar las células XS106. Las células NS47 se cultivaron en RPMIc y las células XS106 en RPMIc suplementado con el sobrenadante de la línea celular NS47 (5%) y GM-CSF (10%). GM-CSF fue obtenido del sobrenadante de cultivos de células J558-GM-CSF.

3.7. Viabilidad celular.

Para medir la viabilidad celular se utilizó la prueba de reducción del metil-tiazol-tetrazolio (MTT) que se basa en la capacidad de las deshidrogenasas succínicas mitocondriales de las células vivas para reducir el metiltiazoltetrazolio a formazán (Mossman 1983). Brevemente, al cultivo de células en una placa de 96 pocillos de fondo plano se agrega una solución 5 mg/ml de MTT (Sigma) en RPMI 1640 al 5% y se deja incubar por 4 horas en estufa de cultivo a 37°C y 5% CO₂. Pasado el tiempo de incubación, se agrega dimetilsulfóxido (DMSO) a los pocillos para re-suspender los cristales de formazán y se detecta en espectrofotómetro a 595 nm. La densidad óptica correspondiente a las células en RPMIc fue considerada como el 100% de viabilidad.

3.8. Cultivos de células XS106 con *M. canis*.

Las células XS106 (2×10^6 /ml) fueron estimuladas por 24 o 48 h con hifas de *M. canis* (50 µl/ml de la suspensión DO 0,08) o con LPS (1 µg/ml) en ausencia o presencia de polimixina B (10 µg/ml). La expresión de CD207 (langerina), CD80, CD40 y MHC-II se detectó por citometría de flujo a las 24 h de cultivo y las citoquinas (IL-6, IL-12, IL-10, IL-23, TNF, IL-4 y TGF-β) se cuantificaron por ELISA de sobrenadantes de cultivo de 48 hs.

3.9. Co-cultivo de células XS106 con células mononucleares de bazo de ratones alogénicos.

Las células XS106 (2×10^5 /ml) fueron estimuladas con *M. canis* o HKMc (50 µl/ml) o en medio solo por 24 horas, se lavaron con PBS 1X y se incubaron con mitomicina C por 30 minutos para inhibir la proliferación celular. Luego de dos lavados con RPMI, las células XS106 fueron co-cultivadas con células mononucleares de bazo (2×10^6 /ml) de ratones BALB/c. Como controles, se cultivaron células mononucleares de bazo sin estímulo o en presencia de anti-CD3. A los 5 días, la proliferación celular de las células mononucleares de bazo fue medida por incorporación de timidina tritiada y determinación de cuentas por minuto (cpm) en contador de centelleo. La producción de citoquinas por las células mononucleares de bazo se cuantificó en sobrenadantes de cultivo por ELISA de captura.

3.10. Explantes de epidermis de orejas de ratones.

Las orejas de ratones C57BL/6 de 8 a 10 semanas de edad se obtuvieron por incisión recta en la base de cada oreja. Luego de la desinfección con etanol 70%, se colocaron en PBS

para hidratarlas. Posteriormente, se separó la piel de la cara dorsal de la oreja del cartílago y se colocó en placas de 24 pocillos con una solución de Dispasa II (Roche) en RPMI 1640 (2 U/ml) con el lado dérmico hacia abajo para separar la epidermis de la dermis. Luego del tiempo de incubación (durante la noche, a 4°C y con agitación leve), se separó la hoja o explante de epidermis completa con pinzas.

3.11. Obtención de células epidérmicas totales (CEpT) de orejas.

Los explantes de epidermis de ratones C57BL/6, obtenidos posterior al tratamiento con Dispasa II, fueron disgregados con tijera y colocados en una solución de Colagenasa D (1 mg/ml en RPMI 1640) por 2 horas a 37°C. Posteriormente, se filtró a través de nylon para formar una suspensión homogénea de células. Las células epidérmicas totales (CEpT) fueron cultivadas en RPMIc en ausencia o presencia de *M. canis* (50 µl, DO 0,08) por 24 horas. La expresión en superficie de MHC-II y CD40 fue medida por citometría de flujo.

3.12. Obtención de células epidérmicas migrantes (CEpM) de orejas.

Los explantes de epidermis de ratones C57BL/6, obtenidos por el tratamiento con Dispasa II, se cultivaron en placas de 48 pocillos en RPMIc con el agregado de 50 µl/pocillo de solución fisiológica (sin estímulo), suspensión de *M. canis* de DO 0,08 (Mc, aproximadamente 4000 UFC/ml) o suspensión de HKMc por 24 hs. Posteriormente, los explantes se lavaron con PBS 1X y se colocaron en una placa de 48 pocillos con RPMIc por 48 hs para la migración de las células desde el explante al medio de cultivo. Luego del tiempo de cultivo, las células epidérmicas migrantes (CEpM) se recogieron (2000 rpm, 5 min) y se re-suspendieron en RPMIc para conteo celular. La viabilidad celular fue evaluada con el ensayo de MTT.

La expresión en superficie de MHC-II y CD40 de las CEpM fue medida por citometría de flujo. En otros experimentos, 4 hs antes de finalizar el cultivo, se realizó una re-estimulación con PMA/Ionomicina/GolgiPlug® y posterior marcación con MHC-II y marcación para citoquinas intracelulares como anti-IL-6.

3.13. Purificación de células de Langerhans.

Las células migrantes de la piel contienen aproximadamente un 8% de células de Langerhans, por lo que estas células se pueden purificar por cell sorting o por perlas inmunomagnéticas a partir de suspensiones de células epidérmicas (Stoitzner 2010). Para

la purificación por cell sorting, se utilizó el anticuerpo anti IA/IE (BD Biosciences, Estados Unidos). Para la purificación por perlas inmunomagnéticas se utilizó el kit de Epidermal Langerhans Cells Microbead kit (Miltenyi Biotec, Alemania) y se siguieron las instrucciones del protocolo del fabricante.

3.14. Co-cultivo de células de Langerhans con células mononucleares de bazo de ratones alogénicos.

Las LC se purificaron con perlas inmunomagnéticas a partir de explantes de epidermis de ratones C57BL/6 incubados por 48h con *M. canis* (Mc), HKMc o con solución fisiológica (las cuales se denominaron LC “pre-activadas”). Posteriormente, las LC purificadas “pre-activadas” fueron co-cultivadas con células mononucleares de bazo obtenidas de ratones BALB/c. Brevemente, se extrajo el bazo de ratones BALB/c y se homogeneizaron en una malla metálica. Previo lavado (2000 rpm, 5 minutos), los esplenocitos se cultivaron en una placa de cultivo de 10 cm de diámetro con RPMIc por 4 horas para la adherencia de linfocitos B, macrófagos y células dendríticas. Las células mononucleares (no adherentes) fueron separadas y cultivadas (3×10^5 células) en placas de 96 pocillos de fondo en “u”, en presencia de las LC (1×10^4) purificadas “pre-activadas” (como se describe más arriba), en presencia de anti-CD3 (1 mg/ml) como control de estimulación de linfocitos T (datos no mostrados) o en medio sólo (sin estímulo). A los 5 días, la proliferación celular de las células mononucleares de bazo fue medida por incorporación de timidina tritiada y determinación de cuentas por minuto (cpm) en contador de centelleo. La producción de citoquinas de los sobrenadantes del co-cultivo de LC con células mononucleares de bazo se cuantificó por ELISA de captura.

3.15. Modelo de infección epicutánea con *M. canis*.

Para el diseño y estandarización del modelo de dermatofitosis por *M. canis* se consideraron procedimientos previamente descritos en modelos de infección en ratones (Hay 1983) y de vacunación epicutánea en humanos (Töke 2014). Se utilizaron 6 a 8 ratones machos de 8-10 semanas de vida como grupos control (no infectados) o infectados.

Los grupos de animales se anestesiaron con inyección intraperitoneal de Ketamina/Xilazina (100/10 µg/kg por peso), se removió el pelo del lomo con una afeitadora eléctrica y posterior depilación con crema depilatoria (Monegar). Sobre el área depilada, se raspó suavemente con una esponja de fibra (50 veces) para remover el estrato

córneo (Töke 2014), se desinfectó con etanol 70% y, luego de su evaporación, se aplicaron sobre la piel 200 µl de solución fisiológica estéril (grupo control) o 200 µl de suspensión de *M. canis* (DO 0,2). Posteriormente, se colocó un parche estéril (Tegaderm, 3M) que permite asegurar el contacto de la piel con el hongo. Este parche es permeable y no produce oclusión de la zona tratada.

Los ratones han sido infectados dentro de las salas de infección del Bioterio de CIBICI-CONICET y han sido mantenidos en salas de infección o en rack auto-aislantes en condiciones normales durante distintos períodos de tiempo (4, 8, 18 y 45 días) durante los cuales fueron monitoreados regularmente.

3.16. Diagnóstico micológico.

Para determinar la efectividad de la infección, se realizó un diagnóstico micológico basado en criterios clínicos, examen directo de muestras de piel con KOH (40%) y aislamiento del hongo en agar Sabouraud luego de los diferentes tiempos post-infección. También se corroboró la infección por análisis histopatológico de cortes de secciones de piel con tinción con ácido periódico de Schiff (PAS) y hematoxilina y tinción con eosina y hematoxilina. A su vez, se cuantificó la carga fúngica a través de la determinación de la concentración de ergosterol (componente principal de la pared celular fúngica) en piel por HPLC (Young 1995, Taniwaki 2006) y por cuantificación de unidades formadoras de colonias en la epidermis.

3.17. Cuantificación de *M. canis* en tejidos.

Para poder cuantificar *M. canis* en la piel por detección de ergosterol (componente principal de la pared celular de los hongos) se adaptó y estandarizó una técnica para la extracción orgánica del ergosterol de la piel de ratones infectados y luego se midió su concentración por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) frente a un testigo de ergosterol (Young 1995, Taniwaki 2006). Los valores obtenidos fueron referidos como carga fúngica y expresados como microgramos (µg) de ergosterol por gramo (g) de piel. Para poder cuantificar *M. canis* en la piel por el recuento de unidades formadoras de colonias (UFC), luego de diferentes días post-infección, se extrajo la piel del lomo de cada animal. Las pieles fueron pesadas e incubadas con tripsina/EDTA (como se describe posteriormente) para la obtención de las células epidérmicas. Posteriormente, 100 µl de la suspensión celular fueron sembrados en placas de agar Sabouraud con cicloheximida. Al día 7 del cultivo, se cuantificaron las unidades formadoras de colonias y los valores

obtenidos fueron referidos como carga fúngica y expresados como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo (g) de piel.

3.18. Diseminación fúngica a tejidos.

Para estudiar si luego de la infección epicutánea *M. canis* invade la dermis o se disemina a órganos profundos, se realizaron cultivos en picos de flauta en agar Sabouraud con y sin cicloheximida de homogenatos de ganglios linfáticos drenantes de piel, bazo, hígado, riñón y cerebro. También se analizaron cortes histológicos de piel del lomo con tinción de PAS/Hematoxilina para observar la presencia del hongo en dermis.

3.19. Obtención y cultivo de células epidérmicas de piel del lomo.

Con el propósito de caracterizar el infiltrado inflamatorio en la piel, la producción de citoquinas por las células epidérmicas y la carga fúngica por UFC (como se describe anteriormente) durante la infección, se extrajeron las secciones de piel del lomo (área depilada) de ratones de los grupos control e infectado. Para obtener la suspensión de células epidérmicas, la piel del lomo se incubó en tripsina/EDTA (0,2/0,075% gramos/volumen en RPMI 1640) con la dermis hacia abajo por 2 horas a 37°C o durante la noche a 4°C. Luego de la incubación, se raspó la capa de epidermis y las células y colgajos obtenidos se procesaron con una malla metálica y posterior filtración con un filtro de 100 µm para obtener una suspensión celular homogénea. Las células epidérmicas se re-suspendieron en RPMIc para el conteo celular. Para los cultivos, las células epidérmicas fueron cultivadas en placas de 96 pocillos con fondo en “u” (1×10^6 cél/pocillo/200 µl RPMIc). En los experimentos para medición de producción de citoquinas en sobrenadante, las células epidérmicas fueron estimuladas con PMA por 5 horas en estufa de cultivo a 37°C y 5% CO₂ o, alternativamente, con PMA/Ionomicina/Golgi Plug[®] por 5 horas en estufa de cultivo a 37°C y 5% CO₂ para medición de producción de citoquinas intracelulares o caracterización celular por citometría de flujo. En los experimentos de medición de especies reactivas del oxígeno, células epidérmicas frescas fueron incubadas con los anticuerpos anti-CD11b y anti-Ly6G junto con la sonda de diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA). Luego de media hora, se analizó por citometría de flujo el porcentaje de expresión de diclorofluorescina (DCF), cuya fluorescencia se mide a 525 nm.

3.20. Cultivos celulares de células de ganglios linfáticos drenantes de piel.

Se extrajeron los ganglios linfáticos inguinales, drenantes de piel del lomo, en los días 4, 8, 18 y 45 post-infección de ratones del grupo control y del grupo infectado. Los ganglios linfáticos se procesaron en una malla metálica con RPMIc, las células obtenidas se lavaron (2000 rpm, 5 min) y se re-suspendieron en RPMIc para obtener suspensiones celulares homogéneas. Luego del conteo celular, las células de ganglios linfáticos drenantes de piel de cada animal se cultivaron en placas de 96 pocillos con fondo en “u” (3×10^5 cél/190 μ l RPMIc/pocillo) y se agregaron 10 μ l de solución fisiológica estéril (sin estímulo) o 10 μ l de HKMc DO 0,08 (estímulo específico). Los cultivos se dejaron en estufa de cultivo a 37°C y 5% CO₂ por 48 o 72 hs. Para la detección de citoquinas en sobrenadante, se recolectaron los sobrenadantes haciendo un pool de células de un mismo animal para cada condición. Para experimentos de citometría de flujo, 4 horas antes de finalizado el cultivo con antígeno específico, se realizó un pool de las células drenantes de nódulos linfáticos de piel del grupo control y del grupo infectado para cada condición (no estimulados – estimulación antígeno-específica) y se re-estimularon con PMA/Ionomicina/GolgiPlug® (1×10^6 cél/200 μ L/pocillo).

3.21. Extracción de ARN mensajero de epidermis y análisis.

El ARN mensajero se extrajo a partir de suspensiones de células epidérmicas de piel de lomo de ratones C57BL/6 (WT) e IL-17RA KO utilizando el kit RNeasy mini Kit (Qiagen, Alemania). Posteriormente, el ADN copia se generó utilizando la enzima Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Estados Unidos) y la PCR cuantitativa fue realizada utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Estados Unidos) en el termociclador Step One Plus (Applied Biosystems, Estados Unidos). Se utilizó el siguiente protocolo: 95°C por 5 minutos seguido de 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por y 95°C por 15 segundos. Los primers fueron obtenidos de PrimerBank.

3.22. Bloqueo sistémico de IFN- γ en ratones infectados con *M. canis*.

Ratones C57BL/6 (WT) e IL-17RA KO infectados con *M. canis* fueron inyectados vía intraperitoneal con un anticuerpo monoclonal anti-IFN- γ (R4-6A2, Thermo Scientific) o control de isotipo (Rat/IgG1) en los días 3 y 6 post-infección. Cada inyección fue de 50 μ g/animal, con una cantidad total de 100 μ g/animal. Luego de 8 días post-infección, los animales fueron sacrificados y se analizó el infiltrado inflamatorio de la epidermis por

citometría de flujo (marcación superficial con anticuerpos anti-CD11b y anti-Ly6G para identificación de neutrófilos) y la producción de citoquinas en sobrenadante por ELISA.

3.23. Depleción de células de Langerhans *in vivo* en ratones Lang-EGFPDTR.

La cepa de ratones Lang-EGFPDTR es una cepa C57BL/6 que ha sido modificada genéticamente para que co-exprese, bajo el promotor de Langerina, el receptor de toxina diftérica humana (DTR) y la proteína verde fluorescente (EGFP) (Kissenpfennig 2005, Kaplan 2008). Por lo tanto, con la inyección de toxina diftérica (DT), estos ratones son un modelo de depleción condicional de las células que expresan langerina (dentro de las cuales se encuentran las células de Langerhans). La depleción fue confirmada por microscopía de fluorescencia en un microscopio Leica, aprovechando la característica que las células langerina positivas expresan EGFP. Por lo tanto, en criosecciones de orejas de ratones Lang-EGFPDTR inyectados vía intraperitoneal con solución fisiológica o con DT, se observó la presencia de células EGFP positivas en la epidermis (Capítulo 4: Resultados, Sección 4.3.).

En los experimentos de infección de ratones Lang-EGFPDTR, cada grupo control o infectado se compuso por 6 a 8 ratones machos Lang-EGPDTR de 8-10 semanas de vida. Un día previo a la infección, se inyectaron 500 ng de toxina diftérica (Merck Millipore, Alemania) vía intraperitoneal. Al día siguiente, los ratones fueron infectados con *M. canis*. A los 8 días post-infección, se extrajeron la epidermis y las células de ganglios linfáticos drenantes de piel, según la descripción previa.

3.24. Análisis estadístico.

Se utilizaron grupos de 6 a 8 animales. Los experimentos fueron repetidos 2 a 3 veces. El análisis estadístico fue realizado con prueba t de Student, ANOVA de una vía o ANOVA de dos vías, dependiendo de la cantidad de variables de cada diseño experimental. Valores de probabilidad mayores al 95% ($p < 0,05$) fueron considerados estadísticamente significativos. Los resultados son expresados como media \pm ESM.

Capítulo 4: Resultados

4.1. Objetivo específico I: Estudiar los efectos de las hifas de *M. canis* en la activación y maduración de las células de Langerhans y la inducción de la respuesta adaptativa frente a *M. canis*.

Las células de Langerhans son células dendríticas exclusivamente localizadas en la epidermis, la cual es la zona de la piel donde invaden los dermatofitos. Para estudiar el efecto de la interacción entre *M. canis* y las células de Langerhans, se utilizó la línea celular XS106, derivada de epidermis murina y con características fenotípicas y funcionales similares a las células de Langerhans (Timares 1998, Takashima 2001).

4.1.1. *M. canis* activa a las células XS106 y promueve la diferenciación Th17 en linfocitos alogénicos.

En primera instancia, se caracterizó la expresión de moléculas de superficie en las células XS106 frente al estímulo con *M. canis*. En la **Figura 8a**, se observa que, luego de 24 hs de incubación con *M. canis* (DO 0,08), las células XS106 aumentaron la expresión de MHC-II y de las moléculas co-estimuladoras CD80 (IFM) y CD40 (porcentaje de expresión) de forma significativa, con respecto a las células XS106 en medio solo. También se determinaron las citoquinas producidas en el sobrenadante de los cultivos y se observó que las células XS106 presentan un aumento significativo en la producción de IL-23, TNF, IL-10 e IL-6, respecto a las células XS106 en medio solo (**Figura 8b**).

Para determinar si las células XS106 podían inducir un perfil de diferenciación en los linfocitos T vírgenes, se realizaron cultivos alogénicos de las células XS106, pre-incubadas con *M. canis*, junto con células mononucleares de bazo de ratones C57BL/6. Luego de 5 días de co-cultivo, se determinó que las células XS106 pre-activadas con *M. canis* inducen la proliferación de las células mononucleares de bazo alogénicas (**Figura 8c**) y, particularmente, estimulan un incremento en la producción de IL-17AF y una disminución en la producción de IL-10, respecto los esplenocitos alogénicos cultivados con las células XS106 pre-incubadas en medio solo (control; $p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente) (**Figura 8d**).

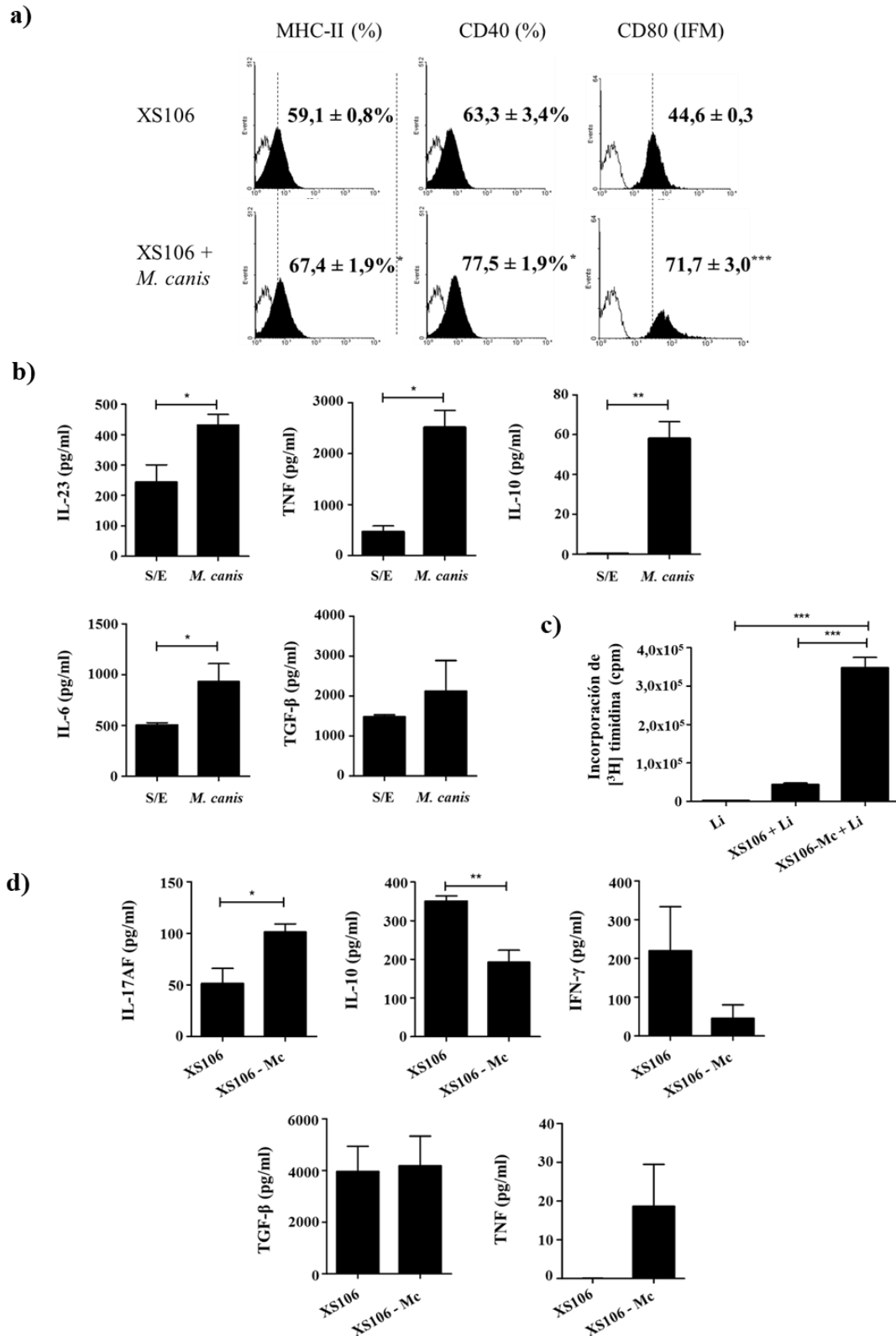


Figura 8. (a) Porcentaje de expresión de MHC-II (*p<0,05) y CD40 (*p<0,02) e intensidad de fluorescencia media (IFM) de CD80 (**p<0,001) y (b) citoquinas en sobrenadante de cultivos de células XS106 sin estímulo (S/E) o estimuladas con *M. canis* (DO 0,08) por 24 hs, *p<0,04, **p<0,002. (c) Proliferación celular por incorporación de timidina tritiada de células

mononucleares de bazo (Li, ratones C57BL/6) en medio solo o luego de co-cultivo (4 días) con células XS106 sin estímulo (XS106) o estimuladas con *M. canis* (XS106-Mc) por 24 hs, *** $p < 0,0001$. **(d)** Citoquinas medidas en sobrenadante de co-cultivos de 4 días de células mononucleares de bazo con células XS106 sin estímulo (XS106) o estimuladas con *M. canis* (XS106-Mc), * $p < 0,04$, ** $p < 0,01$.

Estos resultados demuestran que *M. canis* activa a las células XS106 y éstas pueden inducir un perfil Th17 en linfocitos alogénicos.

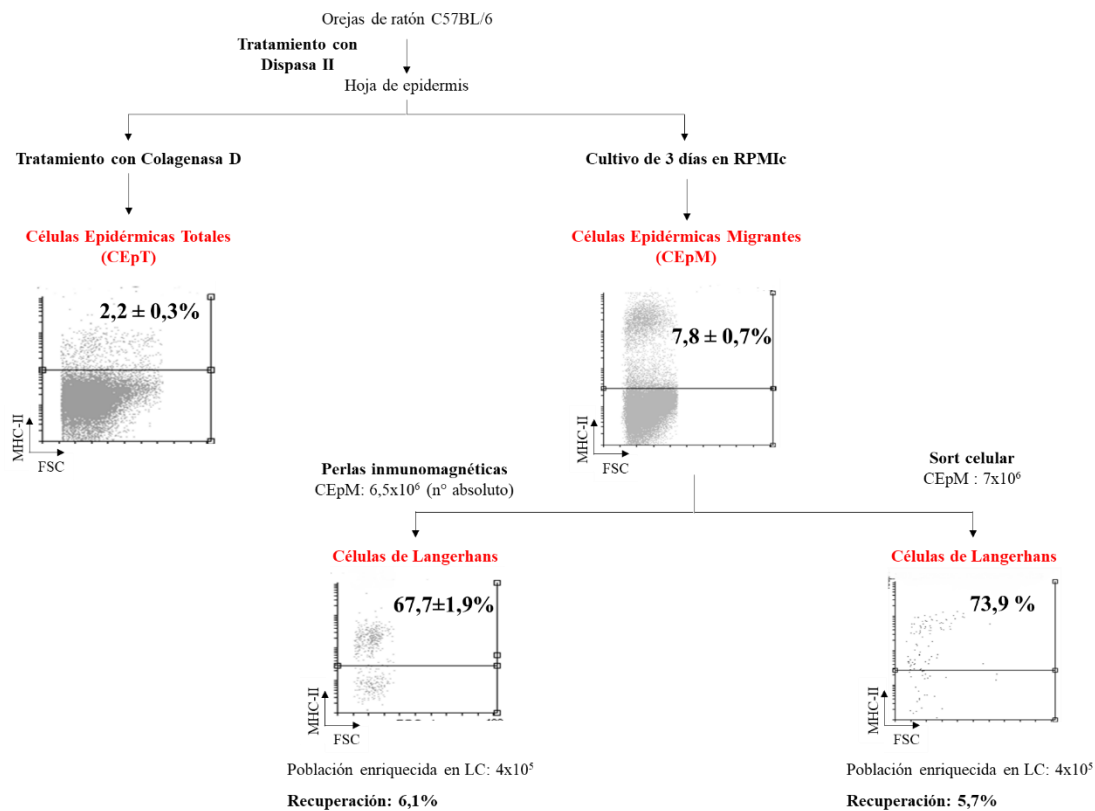
4.1.2. *M. canis* activa a las células de Langerhans en el contexto de la epidermis y genera un ambiente pro-inflamatorio en la piel.

Aunque la línea celular XS106 es fenotípicamente similar a las células de Langerhans (Timares 1998, Takashima 2001), la función de estas células dendríticas se encuentra íntimamente relacionada con la estructura que forman dentro de la epidermis. Por lo tanto, se investigó el efecto de *M. canis* sobre la activación de las células de Langerhans en cultivos de explantes de epidermis de orejas de ratones C57BL/6.

En primera instancia, se estandarizaron diferentes técnicas para obtener las células de Langerhans a partir de la piel. Se utilizó una suspensión de células totales de epidermis (CEpT) y también la obtención de células de Langerhans a partir de la migración desde la epidermis hacia el medio de cultivo (Células epidérmicas migrantes, CEpM), técnica que reproduce la migración desde el tejido hacia los ganglios linfáticos drenantes (Stoitzner 2010). En el caso de las CEpT, la suspensión celular se obtuvo por tratamiento de la hoja de epidermis con Dispasa II y, posteriormente, Colagenasa D (como se describe en Capítulo 3: Materiales y Métodos). Luego de este procedimiento, se obtuvo un $2,2 \pm 0,3\%$ de células de Langerhans, las cuales se identificaron como células MHC-II⁺ (**Esquema 1**). Este porcentaje de células se correlacionó con resultados de técnicas similares (Stoitzner 2010).

Por otra parte, la técnica basada en la migración de las células de Langerhans desde la hoja de epidermis hacia el medio de cultivo, permitió la obtención de una población con un mayor porcentaje de células de Langerhans ($7,8 \pm 0,7\%$ de células MHC-II⁺) respecto a la técnica de células epidérmicas totales (**Esquema 1**). Para purificar las células de Langerhans a partir de las CEpM, se realizó una selección positiva con perlas inmunomagnéticas a partir de las células epidérmicas migrantes. El **Esquema 1** muestra que el cultivo de CEpM permitió una recuperación del 6,1% de células de Langerhans,

con una viabilidad superior al 90%. También se estudió la purificación de las células de Langerhans por separación celular por citometría de flujo (cell sorting) con índices de recuperación similares, pero con una menor viabilidad celular (datos no mostrados).



Esquema 1. Diagrama de técnicas para obtención de células de Langerhans a partir de epidermis de ratones C57BL/6.

Para determinar si las células de Langerhans podían activarse luego del cultivo con *M. canis*, la hoja de epidermis se incubó por 24 horas con hifas vivas (Mc), con GM-CSF al 10% como control positivo de activación (Heufler 1988) o medio solo (sin estímulo: S/E). El análisis por citometría de flujo de las células de Langerhans (población MHC-II⁺ de las CEpM) mostró que las hifas vivas de *M. canis* indujeron un aumento significativo en el porcentaje de expresión (**Figura 9a**) e intensidad de fluorescencia media de MHC-II (**Figura 9b**), con respecto a los controles. Además, el aumento en la intensidad de fluorescencia media de MHC-II fue dependiente de la concentración del inóculo fúngico (**Figura 9c**). Para determinar si la activación de las células de Langerhans dependía de la viabilidad del hongo, el explante de epidermis se incubó por 24 horas con hifas vivas (Mc), hifas muertas por calor (HKMc) o medio solo (sin estímulo: S/E). El análisis por citometría de flujo de las células de Langerhans (población MHC-II⁺ de las CEpM)

mostró que las hifas vivas de *M. canis* estimularon un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia media de MHC-II (**Figura 9d**) y el porcentaje de expresión de CD40 (**Figura 9e**), con respecto a los controles. No se observaron diferencias significativas en la expresión de CD80 (datos no mostrados).

Estos resultados se correlacionaron con el aumento en la producción de IL-6 tanto por las células de Langerhans (población MHC-II⁺) (**Figura 9f**) como en la población epidérmica total (población MHC-II⁻) (**Figura 9g**). Apoyando estos resultados, también se detectó que *M. canis* promueve la producción de IL-6, IL-1 β e IL-23 en sobrenadantes de CEpM (**Figura 9h**). No hubo diferencias significativas en los niveles de TNF, IL-12 e IFN- γ producidos por las CEpM frente a Mc, HKMc o medio solo (datos no mostrados). Además, en cuanto a los cultivos de hojas de epidermis con *M. canis* muerto por calor (HKMc), no se observaron cambios en la producción de citoquinas o expresión de moléculas de superficie en las células de Langerhans con respecto a las células en medio solo (sin estímulo: S/E), por lo que sería necesario la incubación de la piel con el hongo vivo para la activación de las células de Langerhans (**Figura 9**).

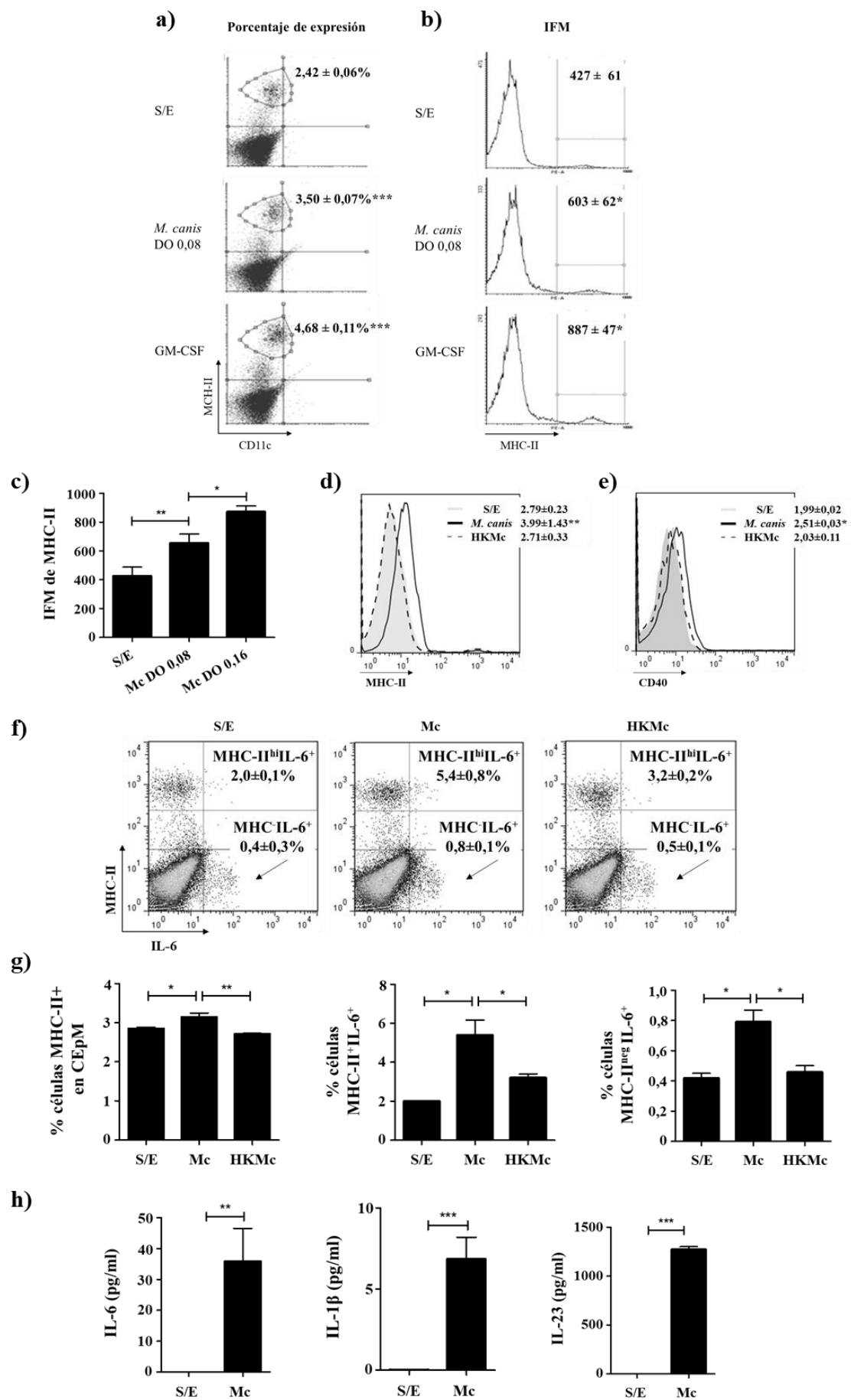


Figura 9. (a) Porcentaje de expresión e (b) intensidad de fluorescencia media (IFM) de MHC-II en población MHC-II⁺ de CEpM de hojas de epidermis en medio solo (sin estímulo: S/E), estimuladas con *M. canis* (Mc, DO 0,08) o con GM-CSF (10%) por 48 hs. (c) Expresión dosis-dependiente de MHC-II⁺ (IFM) de CEpM sin estímulo o estimuladas con *M. canis* (Mc, DO 0,08 y DO 0,16) por 48 hs. *p<0,05, **p<0,004. (d) Intensidad de fluorescencia media (IFM) de MHC-II (**p<0,003) y (e) porcentaje de expresión de CD40 en población MHC-II⁺ (*p<0,02) de CEpM de hojas de epidermis en medio solo (sin estímulo: S/E), estimuladas con *M. canis* (Mc, DO 0,08) o con *M. canis* muerto por calor (HKMc) por 48 hs. (f) Gráficos de citometría y (g) cuantificación del porcentaje de células MHC-II⁺ (*p<0,05, **p<0,006), células MHC-II⁺ productoras de IL-6 (MHC-II⁺IL-6⁺) (*p<0,03) y MHC-II^{neg} productoras de IL-6 (MHC-II^{neg}IL-6⁺) (*p<0,01) en CEpM de hojas de epidermis en medio solo (sin estímulo: S/E), estimuladas con *M. canis* (Mc, DO 0,08) o con *M. canis* muerto por calor (HKMc) por 48 hs. (h) Producción de IL-6, IL-1β e IL-23 en sobrenadante de CEpM estimuladas con Mc (0,08) o sin estímulo (S/E) por 48 hs, **p<0,0001, ***p<0,0001.

En conclusión, las hifas vivas de *M. canis* activan a las células de Langerhans en el contexto de la epidermis e inducen la producción de citoquinas inductoras de IL-17 por las células epidérmicas.

4.1.3. Las células de Langerhans pre-activadas con *M. canis* inducen un perfil Th17 en cultivos alogénicos.

De manera análoga a los experimentos de la línea celular XS106 y, luego de determinar que las células de Langerhans (LC) se activan frente a *M. canis*, se analizó si las LC activadas en la epidermis podían inducir una diferenciación de linfocitos T vírgenes alogénicos. Para ello, se analizó la proliferación y producción de citoquinas de células mononucleares de bazo de ratones BALB/c co-cultivadas con LC purificadas de CEpM de ratones C57BL/6 (pre-incubadas con *M. canis*, con HKMc o sin estímulo). En la **Figura 10a**, se muestra que, tanto el hongo vivo como el hongo muerto, indujeron la proliferación de los esplenocitos, pero sólo los esplenocitos cultivados con LC pre-activadas con hifas vivas (Mc) produjeron un aumento de IL-17AF, respecto a linfocitos estimulados con LC en medio solo o pre-incubadas con HKMc (**Figura 10b**). Particularmente, se observó que el efecto de las hifas de *M. canis* muertas por calor (HKMc) sobre las LC es diferente al del hongo vivo ya que disminuye los niveles de producción de IL-4 y tiende a estimular la producción de IL-10 por los esplenocitos

alogénicos (**Figura 10b**). No se observaron diferencias en la producción de IFN- γ o IL-12 en el sobrenadante de los esplenocitos (**Figura 10b**).

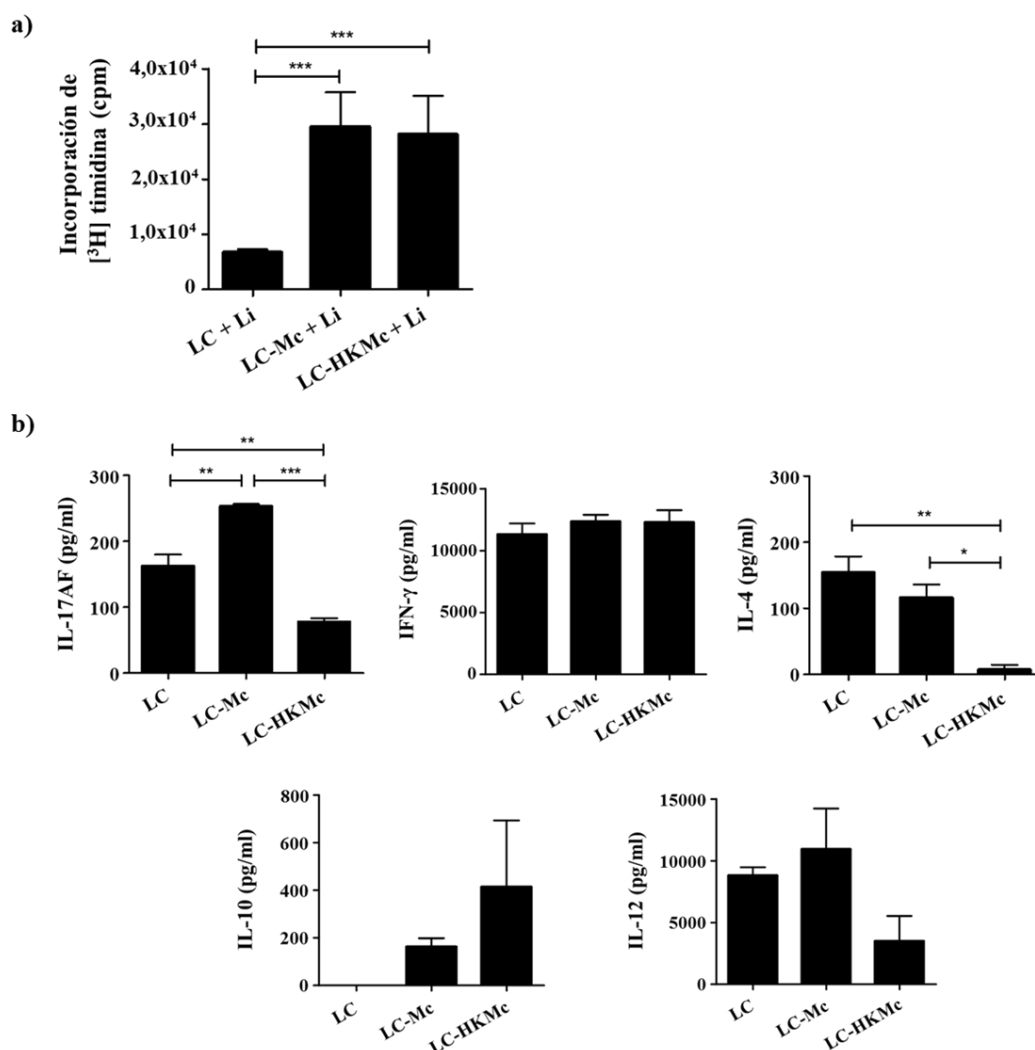


Figura 10. (a) Proliferación celular por incorporación de timidina tritiada de células mononucleares de bazo (ratones BALB/c) luego de 4 días de co-cultivo con células de Langerhans purificadas de CEPm (ratones C57BL/6) en medio solo (LC), con *M. canis* (LC-Mc) o HKMc (LC-HKMc), ***p<0,0001. (b) Citoquinas producidas en sobrenadante de los co-cultivos de células mononucleares de bazo con células de Langerhans en medio solo (LC), con *M. canis* (LC-Mc) o HKMc (LC-HKMc), *p<0,01, **p<0,003, ***p<0,0001.

Por lo tanto, las células de Langerhans pre-activadas con hifas vivas de *M. canis*, en el contexto de la epidermis, pueden diferenciar esplenocitos alogénicos a un perfil Th17.

Objetivo Específico I - Conclusiones

- *M. canis* activa a las células XS106, las cuales derivan de epidermis murina y tienen características fenotípicas y funcionales de células de Langerhans.
- Las células XS106 pre-activadas con *M. canis* pueden inducir un perfil Th17 en linfocitos alogénicos.
- *M. canis* activa la expresión de moléculas MCH-II y co-estimuladoras en las células de Langerhans localizadas en la epidermis. Además, promueve la producción de citoquinas inductoras de IL-17 por la epidermis (IL-6, IL-1 β , IL-23) y por las células de Langerhans (IL-6).
- Las células de Langerhans pre-activadas con el dermatofito en la piel pueden diferenciar esplenocitos alogénicos a un perfil Th17.
- Es necesario el estímulo con hifas vivas de *M. canis* para obtener los efectos observados tanto en la línea celular XS106 como en las células de Langerhans en el contexto de la epidermis.

4.2. Objetivo específico II: Desarrollar un modelo de infección cutánea con *M. canis* en ratones C57BL/6 y caracterizar la respuesta inmune celular antifúngica.

Para determinar si los fenómenos observados *in vitro* podían ser reproducidos *in vivo* durante una infección dermatofítica, fue necesario desarrollar un modelo de dermatofitosis epicutánea con *M. canis*.

Considerando resultados de trabajos previos de infecciones en cobayos y ratones (Hay 1983, Cambier 2014) y de modelos de vacunación epicutánea (Töke 2014), se desarrolló un nuevo modelo de dermatofitosis por infección epicutánea en ratones C57BL/6, el cual podría reproducir las características de la dermatofitosis en humanos (**Esquema 2**).

Como se describe en Materiales y Métodos, para lograr la infección fue necesario depilar y exfoliar suavemente el lomo de los ratones para poder establecer la infección (Hay 1983). A su vez, la colocación de un parche adhesivo permeable permitió asegurar el contacto del hongo con la piel durante las primeras horas de la infección.

Preparación



Rasurado



Depilación



Exfoliación



Desinfección

Infección con *M. canis*



Infección



Colocación parche adhesivo



Esquema 2. Esquema de infección de dermatofitosis experimental.

A continuación, se describen los resultados obtenidos *in vivo*.

4.2.1. La dermatofitosis experimental con *M. canis* en ratones C57BL/6 se asemeja a la infección en humanos.

Se realizó una infección con hifas de *M. canis* (DO 0,2) en el lomo de ratones C57BL/6 y se estudió la cinética de infección (**Figura 11**). En primer lugar, se observó que todos los ratones infectados comenzaron a tener lesiones alrededor del día 3 y 4 post-infección (p.i.) con características típicas de una infección dermatofítica como descamación, eritema y alopecia. Las máximas lesiones fueron evidentes al día 8 p.i. y, para el día 18 p.i., ya no se observaron lesiones en la piel y el pelo creció nuevamente. Estas características clínicas y la auto-resolución de la infección se asemejan a la *tinea capitis* no inflamatoria en pacientes inmunocompetentes (John 2016).

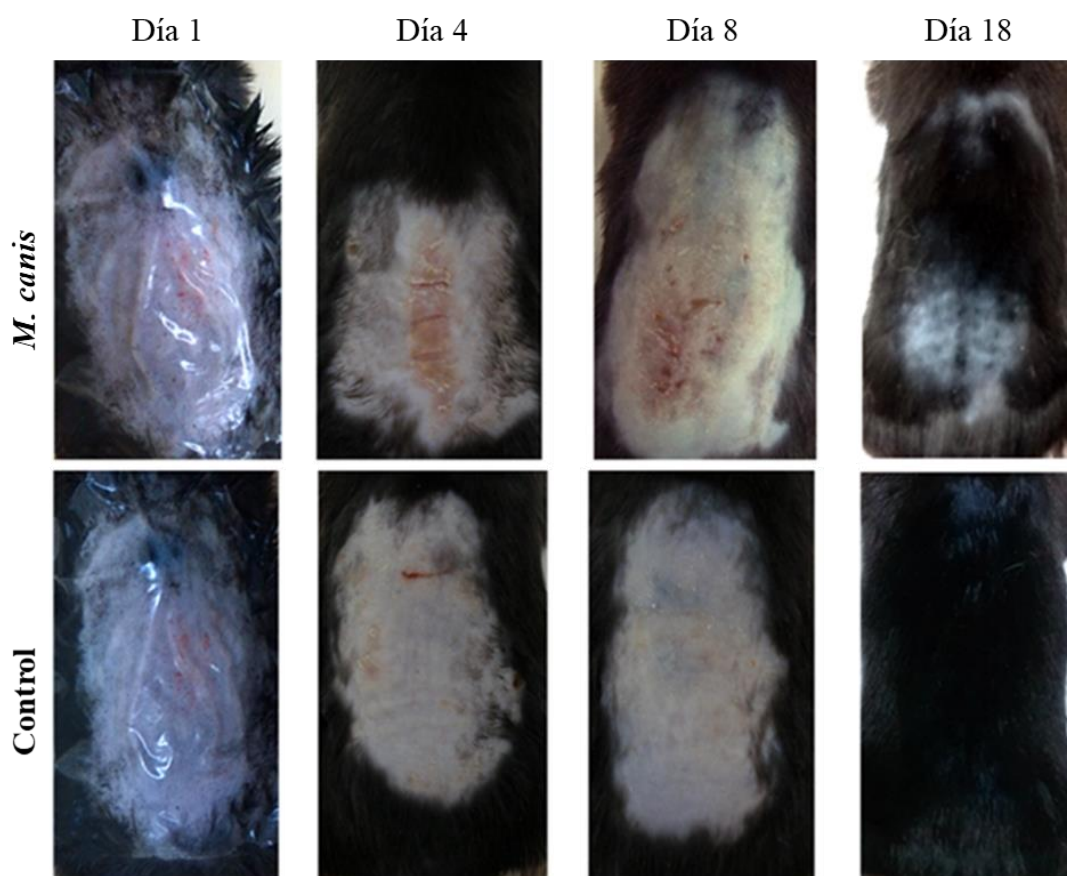


Figura 11. Evolución clínica de la dermatofitosis epicutánea en ratones C57BL/6 sin infectar (control) o infectados con *M. canis*. Imágenes del lomo a los días 1, 4, 8 y 18 post-infección.

Como también se muestra en la **Figura 11**, los ratones del grupo control, que fueron sometidos al mismo tratamiento (afeitado, depilación, abrasión, desinfección y parche),

presentaron un leve enrojecimiento sin ninguna lesión en el lomo y también recuperaron el crecimiento del pelo para el día 18 p.i.

El estudio histopatológico de biopsias de lesiones demostró la presencia de hifas PAS positivas (tinción PAS/Hematoxilina) en la capa córnea de la epidermis e invadiendo los folículos pilosos (indicados por flechas) a los días 4 y 8 p.i (**Figura 12a, b y c**). Además, se evidenció un engrosamiento de la epidermis (acantosis), lo cual es una característica de la dermatofitosis y de procesos inflamatorios en la piel, observándose hasta 7 a 12 células de grosor de la epidermis en ratones infectados, comparados con 2 a 4 células de grosor en los ratones control (**Figura 12a**, indicado con barras en la epidermis, y **Tabla 2** en página 54). En cuanto a la respuesta inflamatoria asociada a las estructuras fúngicas, la histopatología reveló la presencia de un infiltrado inflamatorio en la epidermis y dermis conformado predominantemente por polimorfonucleares neutrófilos (**Figura 12a y b**, indicados con asterisco, y **Tabla 2** en página 54) a los días 4 y 8 p.i. De manera similar a lo demostrado en otros modelos de dermatofitosis experimental (Hay 1983, Cambier 2014) y en infecciones en humanos (Szepes 1993, Koga 2005), los neutrófilos infiltrantes se encontraron formando micro-abscesos epidérmicos alrededor de las hifas (**Figura 12a y b**). Este mecanismo, junto con la proliferación de la epidermis, han sido descritos como mecanismos para expulsar las hifas del tejido (Brasch 2009). En la **Figura 12d** se muestra, además, un examen directo de pelo donde se observó las artroconidias de *M. canis* infectando el pelo de forma ectotrix, lo cual también es una característica de *tinea capitis* (Hay 2017). Para el día de la resolución de la infección (18 p.i.), no se evidenció la presencia de hongo en ninguna de las capas de la piel y la epidermis recuperó su arquitectura normal (2 a 3 células) (**Figura 12a y Tabla 2** en página 54). Las características clínicas e histopatológicas también se presentan resumidas en la **Tabla 2** (Página 54).

Por otra parte, en los días estudiados no se observó la invasión de hifas de *M. canis* hacia la dermis o diseminación extra-cutánea, evaluada mediante el cultivo de homogenatos de tejidos en medio de Sabouraud (ganglios drenantes de piel, riñón, bazo, hígado y cerebro).

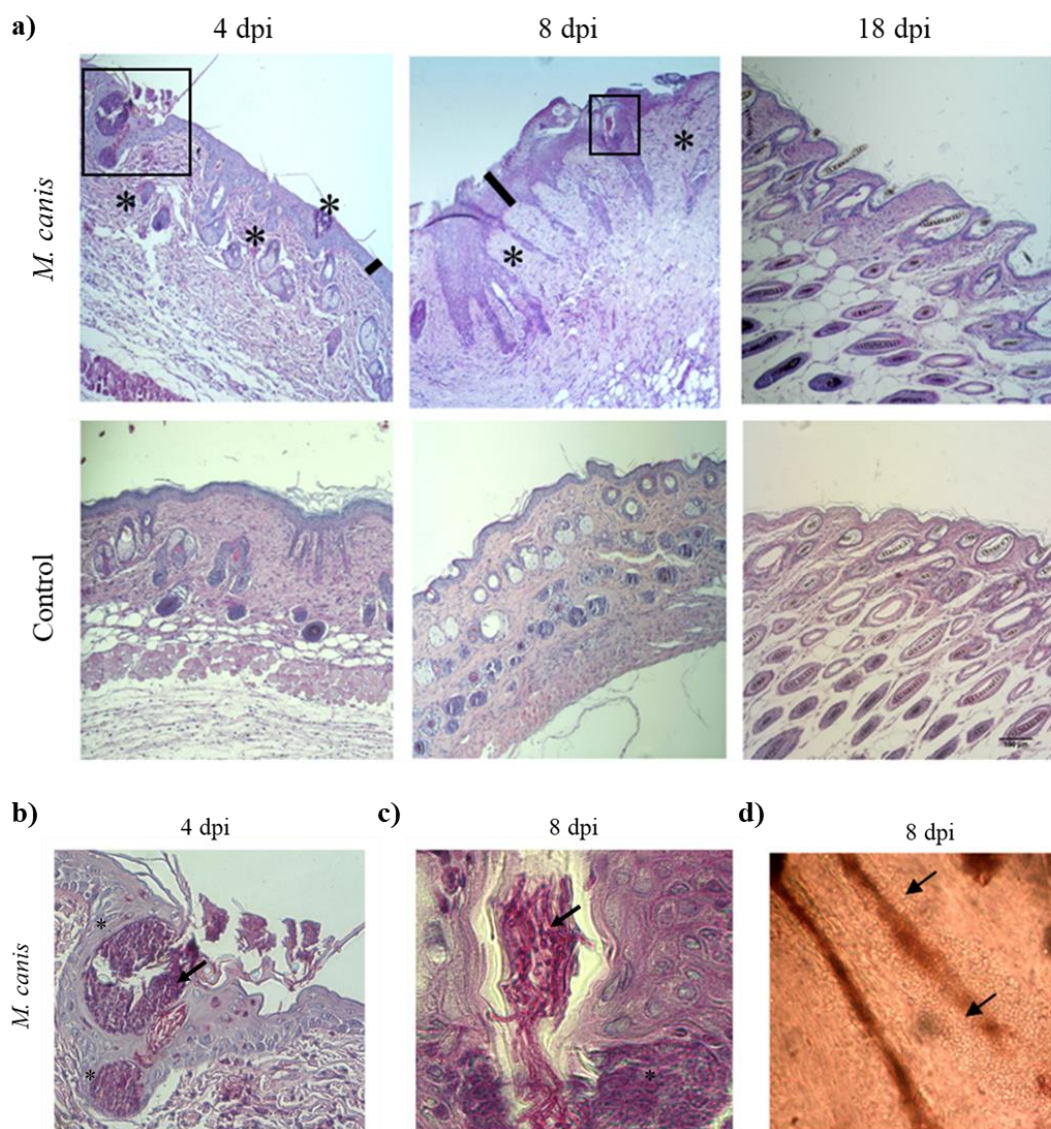


Figura 12. Cortes histológicos de biopsias de piel del lomo de ratones C57BL/6 sin infectar (control) o infectados con *M. canis* al día 4, 8 y 18 p.i. teñidos con PAS-hematoxilina (a) Imágenes (100x), grosor de la epidermis indicado con barras, infiltrado inflamatorio indicado con asteriscos e hifas PAS+ indicadas con flechas. (b) Ampliación (400x) de la zona marcada en (a) al día 4 p.i. Hifas PAS+ indicadas con flechas. (c) Ampliación (1000x) de la zona marcada en (a) al día 8 p.i. Hifas PAS+ indicadas con flechas. (d) Examen de pelos infectados con KOH (40%) demostrando la parasitación ectotrix de pelo del lomo, artroconidias indicadas con flechas (400x).

Para confirmar el análisis histopatológico y caracterizar la inflamación local en la piel, se realizó una citometría de flujo de las células epidérmicas luego del tratamiento de la piel con tripsina. Efectivamente, se observó un aumento significativo del porcentaje de neutrófilos, definidos como células $CD11b^{+}Ly6G^{+}$, en la epidermis de los ratones infectados, comparados con los controles ($p < 0,0001$) (**Figura 13a**). Coincidiendo con

los hallazgos histopatológicos y la presencia de lesiones, en los ratones infectados se detectó la presencia del hongo mediante la medición de la carga fúngica a los días 4 p. i. (262 ± 98 UFC/g de piel) y 8 p. i. (1130 ± 411 UFC/g de piel), mientras que no se recuperaron colonias al día 18 post-infección (**Figura 13b**).

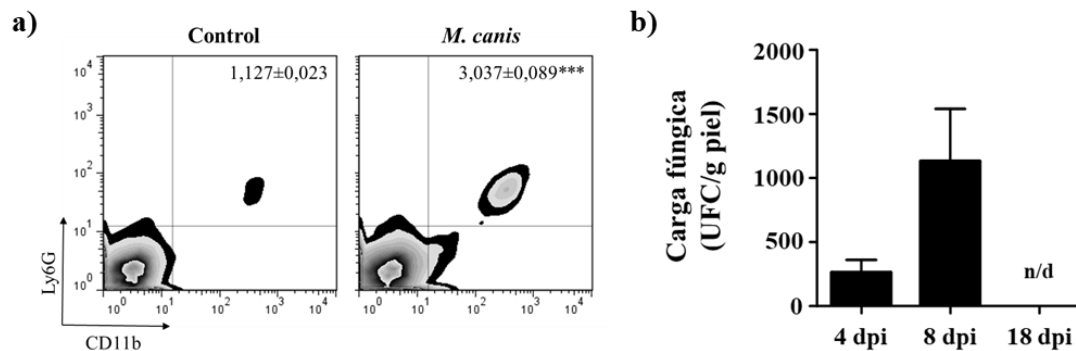


Figura 13. (a) Porcentaje de población $Ly6G^{+}CD11b^{+}$ ($***p < 0,0001$) y (b) carga fúngica de piel del lomo de ratones C57BL/6 sin infectar (control) o infectados con *M. canis*, al día 8 p.i.

Por lo tanto, el modelo de dermatofitosis epicutánea con *M. canis* en ratones C57BL/6 es una infección reproducible que se caracteriza por la infiltración de neutrófilos en la epidermis y se correlaciona con otros modelos de dermatofitosis experimental y humana.

4.2.2. La dermatofitosis experimental en ratones C57BL/6 se caracteriza por una respuesta *Th17*.

Para evaluar la respuesta adaptativa que predomina durante la dermatofitosis experimental, se estudió la respuesta inmune en los ganglios linfáticos drenantes de piel. Para ello, las células de los ganglios linfáticos inguinales de ratones infectados y controles se re-estimularon con antígenos de *M. canis* (HKMc) o se cultivaron sin estímulo (S/E) y se evaluó la producción de citoquinas en sobrenadante.

En primer lugar, reflejando la inflamación luego de la infección efectiva en la piel, los animales infectados con *M. canis* mostraron un aumento significativo en el número absoluto de las células de ganglios linfáticos drenantes de piel durante el curso de la infección, comparado con los animales control (**Figura 14a**).

El análisis de la producción de citoquinas en los sobrenadantes de cultivo demostró que, luego de la re-estimulación con HKMc, las células de los ratones infectados produjeron un aumento significativo de IL-17AF respecto a los controles, particularmente al día 8 p.i. (3.939 ± 1.015 vs. $409,4 \pm 165,9$ pg/ml, $p < 0,001$) y 18 p.i. (1.355 ± 250 pg/ml, $p < 0,01$) (**Figura 14b**). Además, no se detectó un aumento de IL-17AF en las células de animales

control o infectados en medio solo (**Figura 14b**). Por otra parte, no se observaron diferencias en la producción de IFN- γ e IL-10 durante el curso de la infección (**Figura 14b**). Sin embargo, al día 8 p.i., se observó un aumento inespecífico de estas citoquinas, tanto en los animales controles como infectados (en ausencia o presencia de HKMc), lo cual podría deberse al proceso de abrasión de la piel en todos los grupos de animales. De manera similar, no se detectaron diferencias de TNF, IL-6 e IL-23 (datos no mostrados). Con el propósito de determinar la población de linfocitos que produce IL-17, se analizó la producción de IL-17A en las células de los ganglios linfáticos por citometría de flujo. Se observó un aumento significativo en el porcentaje de células CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺ productoras de IL-17A sólo en los animales infectados, respecto a los controles, y luego del estímulo con HKMc (**Figura 14c**). Además, el porcentaje de células productoras de IL-17A fue mayor en la población de linfocitos T CD4⁺ (**Figura 14c**). No se observó producción de IL-17F en ninguno de las condiciones (datos no mostrados).

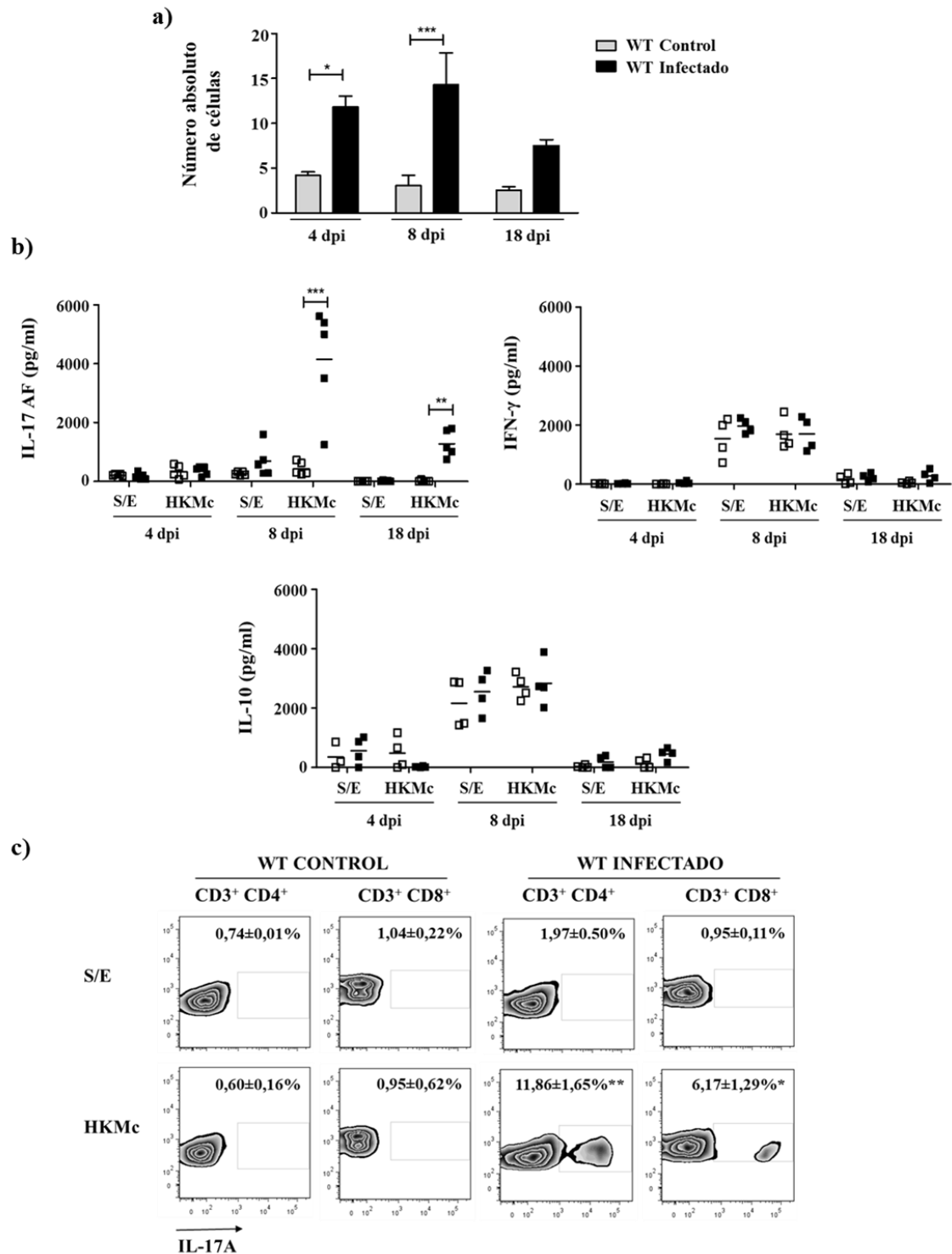


Figura 14. (a) Número absoluto de células de ganglios linfáticos drenantes de piel de ratones C57BL/6 sin infectar (control) o infectados con *M. canis* a los días 4, 8 y 18 p.i., * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. (b) Producción de citoquinas en el sobrenadante de cultivos de células de ganglios linfáticos drenantes de piel de ratones C57BL/6 infectados con *M. canis* (■) y ratones control (□), sin re-estimular (S/E) o re-estimuladas con HKMc por 48 hs, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. (c) Producción de IL-17A por células CD4⁺ y CD8⁺ (con previa selección de población CD3⁺) de

ganglios drenantes de piel sin estimular (S/E) o re-estimuladas con HKMc por 48 hs, * $p < 0,02$, ** $p < 0,005$.

Teniendo en cuenta que la infección con *M. canis* promueve específicamente una respuesta de tipo Th17, el próximo objetivo fue estudiar la importancia de las citoquinas IL-17 en el control de la infección.

4.2.3. La señalización por IL-17RA es requerida para controlar la proliferación fúngica y modular la respuesta inflamatoria.

Para evaluar la evolución de la infección en ausencia de la inmunidad mediada por IL-17, se utilizaron ratones deficientes para la subunidad A del receptor de IL-17 (IL-17RA KO). En la **Figura 15** se muestra que, de manera similar a los animales WT, los ratones IL-17RA KO infectados mostraron lesiones alrededor de los días 3 y 4 p.i. Sin embargo, la diferencia más notable respecto a los WT fue particularmente al día 8 p.i., cuando los ratones IL-17RA KO infectados presentaron lesiones húmedas y ulceradas, en placa y con costras amarillentas. Estas características clínicas se asemejan a la *tinea capitis* inflamatoria en humanos, mientras que los ratones WT, como se describió anteriormente, presentaron lesiones secas y descamativas, parecidas a la *tinea capitis* no inflamatoria (**Figuras 11 y 15**). Sin embargo, para el día 18 p.i., la mayoría de los ratones IL-17RA KO ya no presentaban lesiones y habían recuperado el pelo, lo cual evidencia que la cinética de infección, aunque levemente retardada, fue similar en ambas cepas de ratones. Además, no se observaron lesiones cutáneas posteriores al día 20 p.i., demostrando que ambas cepas de ratones no sufrieron recidivas, al menos, hasta el día 45 p.i.

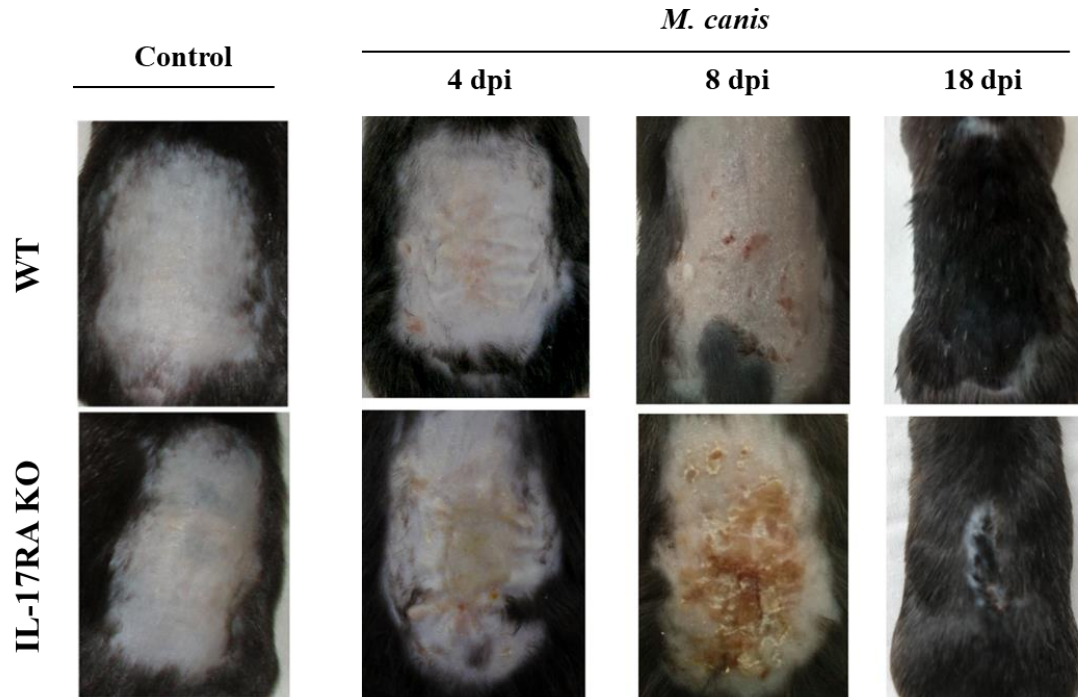


Figura 15. Evolución clínica de la dermatofitosis en ratones C57BL/6 (WT) y en ratones IL-17RA KO. d.p.i: días post-infección.

El análisis histopatológico de cortes de piel del lomo de los ratones WT e IL-17RA KO infectados mostró que los ratones deficientes en la señalización IL-17/IL-17RA presentaban una intensa invasión fúngica superficial evidenciada por una mayor presencia de hifas tanto en el estrato córneo como en los folículos pilosos (**Figura 16a, b y c**, indicado por flechas). Estos ratones presentaron además una fuerte reacción inflamatoria en la piel (**Figura 16a, b, c, e y f** indicado por asteriscos), con respecto a los ratones WT, en los días 4 y 8 p.i. De manera similar a los WT, los ratones IL-17RA KO presentaron microabscesos de neutrófilos adyacentes a las hifas (**Figura 16a, b, c, e y f**, indicado por asteriscos). Sin embargo, para el día 18 p.i., los ratones IL-17RA KO todavía presentaron hongo dentro de microabscesos en los folículos pilosos (**Figura 16a y d**, indicado con asteriscos) coincidiendo con la presencia de pequeñas lesiones en algunos animales.

Por otra parte, los IL-17RA KO no presentaron signos de acantosis como los observados en los ratones WT infectados, en los diferentes tiempos post-infección (**Figura 16a**). En este sentido, la **Tabla 2** muestra que, al día 8 p.i., los ratones WT presentaron una epidermis con 7 a 12 células de grosor de epidermis, mientras que los animales IL-17RA KO presentaron 3 a 4 células durante el curso de la infección (**Figura 16a**, indicado por

barras). Este resultado sugiere defectos en la proliferación de la epidermis relacionados con la deficiencia de señalización de IL-17 (Pappu 2012).

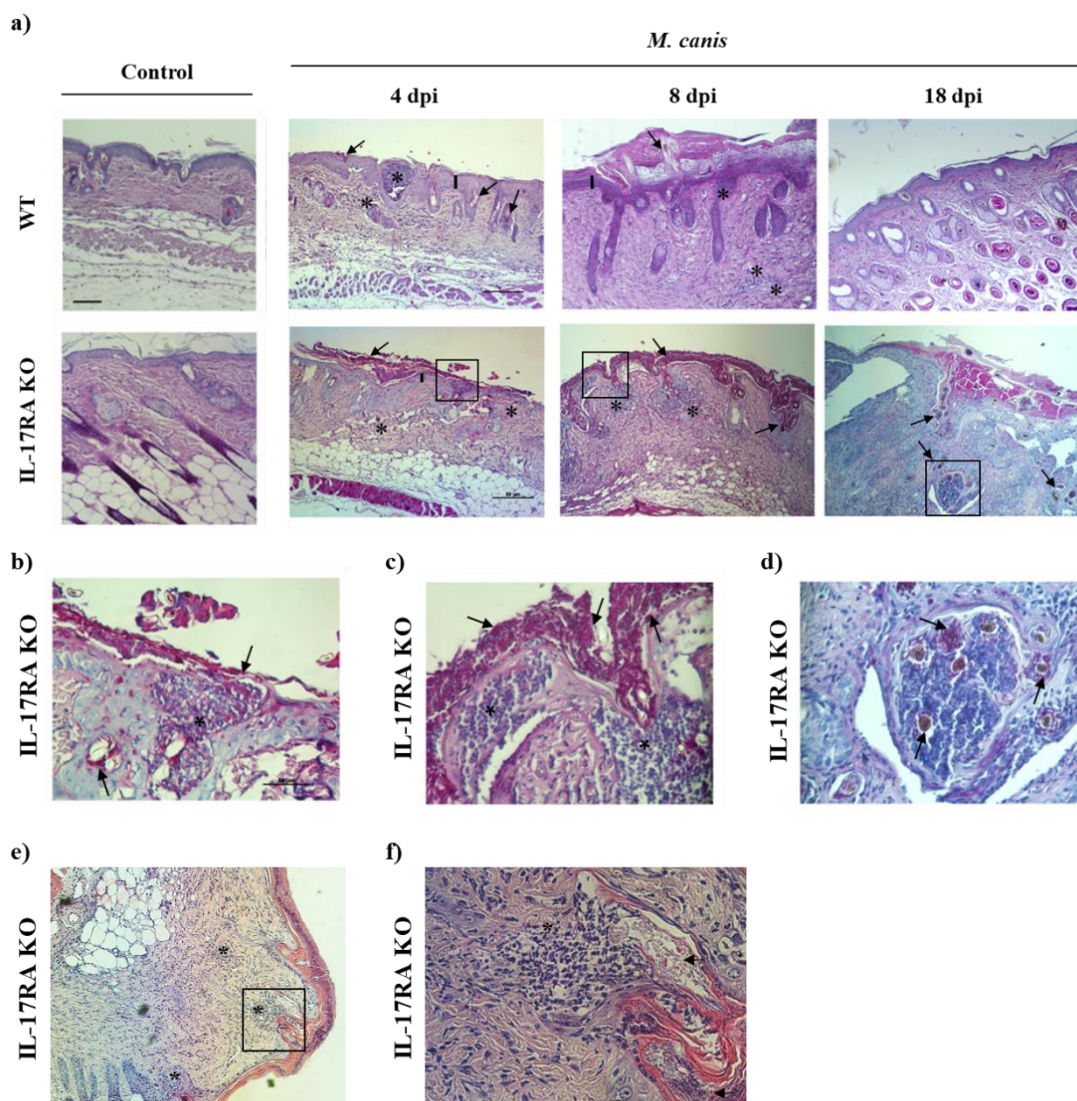


Figura 16. Cortes histológicos de biopsias de piel del lomo de ratones WT e IL-17RA KO controles e infectados con *M. canis* al día 4, 8 y 18 p.i. **(a)** Imágenes (100x) con tinción PAS/hematoxilina. Grosor de la epidermis indicado con barras, infiltrado inflamatorio indicado con asteriscos e hifas PAS+ indicadas con flechas. **(b)** Ampliación (400x) de la zona marcada en (a) IL-17RA KO al día 4 p.i. Hifas PAS+ indicadas con flechas. **(c)** Ampliación (400x) de la zona marcada en (a) IL-17RA KO al día 8 p.i. Hifas PAS+ indicadas con flechas, infiltrado inflamatorio indicado con asteriscos. **(d)** Ampliación (400x) de la zona marcada en (a) IL-17RA KO al día 18 p.i. Hifas PAS+ indicadas con flechas. **(e)** Imagen (100x) con tinción hematoxilina/eosina de IL-17RA KO al día 8 p.i. Infiltrado inflamatorio indicado con asteriscos. **(f)** Ampliación (400x) de la zona marcada en (e) IL-17RA KO al día 8 p.i. Hifas indicadas con flechas, infiltrado inflamatorio indicado con asteriscos.

La **Tabla 2**, muestra un análisis histopatológico comparativo de la dermatofitosis experimental en los ratones WT e IL-17RA KO.

	d.p.i	Invasión fúngica	Erosión/ costra	Acantosis (Nº células)	Abscesos en epidermis	Infiltrado en dermis
WT	4	+ ¹	+	++ (5-10)	++	++ (PMN/Mo)
	8	+/- ¹	++	+++ (7-12)	+	+ (PMN/Mo)
	18	-	-	+ (3-4)	-	+ (Mo)
IL-17RA KO	4	++ ²	++	+ (3-7)	++	++ (PMN)
	8	++++ ²	++++	+ (2-6)	+++	+++ (PMN/Mo)
	18	+/- ¹	+	+ (2-4)	+	+ (Mo)

Tabla 2. Descripción semicuantitativa del análisis histológico de biopsias de piel de ratones WT e IL-17RA KO infectados a los días 4, 8 y 18 p.i. Referencias: **1.** Hongo dentro de folículo piloso. **2.** Hongo dentro de folículo piloso y estrato córneo. **PMN** Neutrófilos. **Mo** células mononucleares. Leve: +, moderado: ++, intenso: +++, muy intenso: ++++.

Para cuantificar la carga fúngica, se estandarizó una técnica de extracción de ergosterol (componente de la pared celular de *M. canis*) de la piel y posterior cuantificación por HPLC respecto a un control estándar de ergosterol. Tal como se observó en la histopatología, la determinación de ergosterol demostró que los ratones IL-17RA KO tienen una carga fúngica 5 veces mayor que los ratones WT al día 8 p.i. ($p < 0,003$) (**Figura 17a**). También se evaluó la carga fúngica relacionada con la cinética de la infección en los ratones WT e IL-17RA KO (**Figura 17b**). La cuantificación de las unidades formadoras de colonias (UFC) a partir de suspensiones de las células epidérmicas de la piel del lomo demostró que, luego de 4 días p. i., ambas cepas de animales presentan una carga fúngica similar (WT: 431 ± 183 UFC/g piel, IL-17RA KO: 621 ± 46 UFC/g piel, diferencia estadísticamente no significativa). Coincidiendo con los resultados de la cuantificación de ergosterol, al día 8 p.i., los ratones IL-17RA KO mostraron un aumento significativo de la carga fúngica, respecto a los ratones WT (WT: 1130 ± 411 UFC/g piel, IL-17RA KO: 46482 ± 15923 UFC/g piel, $p < 0,01$) y, luego de 18 días p.i., no se detectaron UFC en la piel de los ratones WT mientras que todavía se aislaron colonias en la piel de los ratones IL-17RA KO (WT: n/d, IL-17RA KO: 1182 ± 289 UFC/g piel). A su vez, el recuento positivo de colonias al día 18 p.i. en la piel confirma los hallazgos histológicos

que muestran una cinética de eliminación fúngica levemente retardada en los ratones IL-17RA KO (**Figura 16**). Luego de 25 días post-infección, no se aisló el hongo en los cultivos ni se observaron estructuras fúngicas en la piel en los análisis histológicos de animales WT e IL-17RA KO. Además, independientemente de la cantidad de hongo en la piel, en ambas cepas de ratones se observó que *M. canis* siempre infecta la epidermis sin diseminación extra-cutánea.

Al día 8 p.i, la determinación de la carga fúngica en el tejido por cuantificación de UFC muestra un aumento de 10 veces en la cantidad de hongo en la piel de los ratones IL-17RA KO frente a los ratones WT mientras que, mediante la cuantificación de *M. canis* por ergosterol, el aumento es de 5 veces. Aunque ambas técnicas sirven para detectar el hongo en el tejido, esta diferencia podría deberse a una menor sensibilidad de la técnica de ergosterol, ya que se basa en la eficiencia de la extracción de este compuesto de la membrana plasmática del hongo presente en el tejido infectado. La determinación de la carga fúngica por UFC demuestra, además, la presencia de hongo viable.

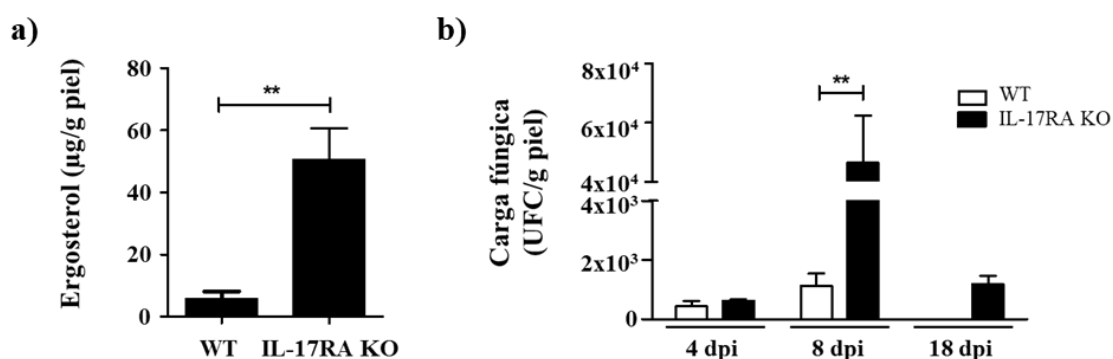


Figura 17. (a) Determinación de la carga fúngica de *M. canis* en piel por (a) concentración de ergosterol por HPLC (** $p < 0,003$) y por (b) cuantificación de UFC en piel en ratones WT e IL-17RA KO a los días 4, 8 y 18 p.i. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

Para evaluar el aumento del infiltrado de neutrófilos en los ratones IL-17RA KO, respecto a los WT infectados, se analizó la población CD11b⁺Ly6G⁺ en la epidermis por citometría de flujo. Coincidiendo con lo observado en la histopatología, los ratones IL-17RA KO presentaron un infiltrado epidérmico tres veces mayor al observado en los ratones WT infectados ($p < 0,0001$) (**Figura 18a**). A su vez, este resultado fue apoyado por el aumento en la expresión relativa de ARN mensajero de CXCL1, una quimiocina que atrae neutrófilos (**Figura 18b**). Además, se observó que la función de los neutrófilos de los ratones IL-17RA KO es semejante a los ratones WT. En este sentido, la **Figura 18c** y **d** muestran la producción de especies reactivas del oxígeno en la epidermis de ambas cepas.

El análisis por citometría de flujo demuestra que no hay diferencias significativas en la intensidad de fluorescencia media de diclorofluorescina (DCF) en la población de neutrófilos, lo cual indica su capacidad de oxidación y se relaciona con el estallido respiratorio. Coincidiendo con estos datos, en los cortes histológicos de la piel de los ratones IL-17RA KO se observó que los neutrófilos efectivamente envuelven a las hifas, sugiriendo una actividad antifúngica local similar a lo reportado en los ratones WT (**Figuras 12a, b y c, Figura 18e**). Por lo tanto, estos resultados demuestran que, en el contexto de la infección epicutánea con *M. canis*, el reclutamiento de neutrófilos y su funcionalidad no estarían afectados por la deficiencia en la señalización IL-17/IL-17R. Para profundizar la caracterización de la inflamación durante la dermatofitosis, se analizaron las citoquinas producidas por las células epidérmicas al día 8 p.i. en los ratones WT e IL-17RA KO. Se observó que los ratones IL-17RA KO muestran un aumento significativo de las citoquinas pro-inflamatorias TNF, IFN- γ , IL-17AF, IL-23, IL-6 e IL-10, con respecto a los ratones WT infectados (**Figura 18f**).

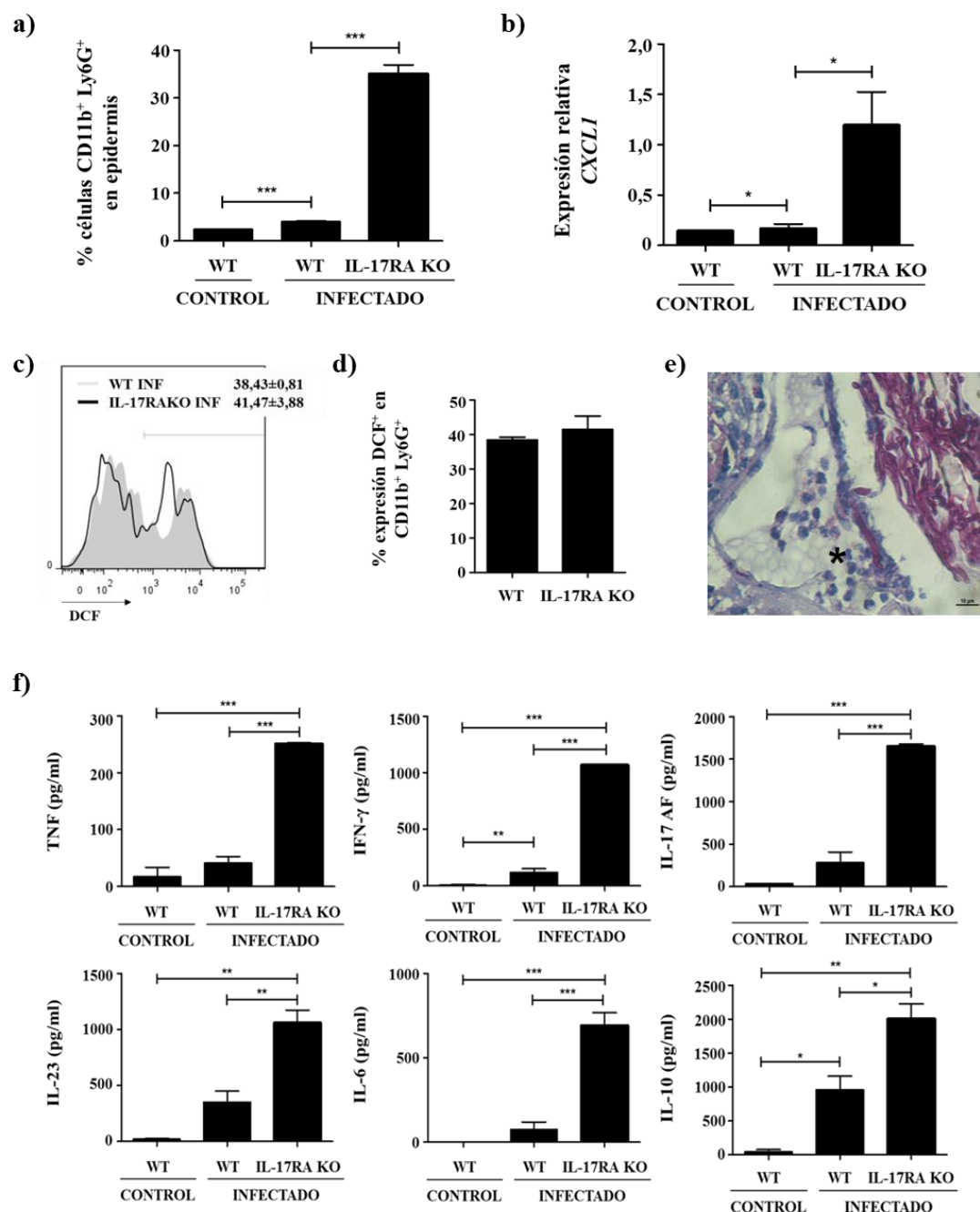


Figura 18. (a) Porcentaje de células $Ly6G^+CD11b^+$ y (b) expresión de ARN mensajero de *CXCL1* (relativa al gen 12srRNA) en células epidérmicas de piel del lomo de ratones WT sin infectar (control) y ratones WT e IL-17RA KO infectados con *M. canis*, al día 8 p.i., ***p<0,0001. (c) Intensidad de fluorescencia media de diclorofluorescina (DCF) en células epidérmicas totales de ratones WT e IL-17RA KO infectados. (d) Porcentaje de expresión de DCF en neutrófilos (población $Ly6G^+CD11b^+$) en epidermis. (e) Imagen microscópica de la epidermis (400x) de ratones IL-17RA KO infectados, infiltrado inflamatorio indicado con asteriscos e hifas PAS+ indicadas con flechas. (f) Citoquinas producidas en el sobrenadante de células epidérmicas de ratones WT sin infectar (control) y ratones WT e IL-17RA KO infectados con *M. canis* al día 8 p.i, luego de 5 horas de re-estímulo con PMA. *p<0,01, **p<0,002, ***p<0,0001.

Estos datos, junto con el aumento del infiltrado de neutrófilos, confirman que la deficiencia en la señalización vía IL-17/IL-17R en la dermatofitosis experimental establece un ambiente altamente pro-inflamatorio en la piel.

Cabe destacar que, al día 4 post-infección, no se detectó la producción de citoquinas en los sobrenadantes de cultivos de las células epidérmicas de ratones WT o IL-17RA KO. De manera similar, la carga fúngica en la piel no demostró diferencias entre ambas cepas de ratones (**Figura 17b**). Por lo tanto, los datos sugieren que la inflamación cutánea exacerbada se relacionaría con la elevada proliferación fúngica observada en la piel de los ratones IL-17RA KO luego de 8 días post-infección.

4.2.4. Los ratones IL-17RA KO desarrollan una respuesta Th1 durante la dermatofitosis por M. canis.

Para estudiar si la respuesta adaptativa en los ratones IL-17RA KO se encuentra relacionada con la respuesta local en la piel, se realizaron cultivos de células de ganglios linfáticos drenantes de piel, re-estimuladas con HKMc. En primer lugar, coincidiendo con la mayor inflamación en la piel, se observó que los ratones IL-17RA KO infectados presentaron un aumento significativo en el número absoluto de células en los ganglios linfáticos drenantes de piel, comparado con los animales WT, en el curso de la infección (**Figura 19a**). A su vez, estas células produjeron IL-17AF en cantidades similares a los ratones WT (**Figura 19b**) pero también mostraron un aumento significativo en la producción de IFN- γ en el sobrenadante (**Figura 19c**). Particularmente, al día 8 p.i., se observó que las células de los ratones IL-17RA KO produjeron, aproximadamente, tres veces más IFN- γ que las células de los ratones WT. De acuerdo con esto, se observó un incremento en el porcentaje de células T CD4⁺ y CD8⁺ productoras de IFN- γ ($p < 0,01$) (**Figura 19c y d**). Tal como se describió anteriormente (**Figura 14b**), al día 8 p.i., no hubo diferencias significativas en la producción de IFN- γ entre los ratones WT controles o infectados (**Figura 19e**).

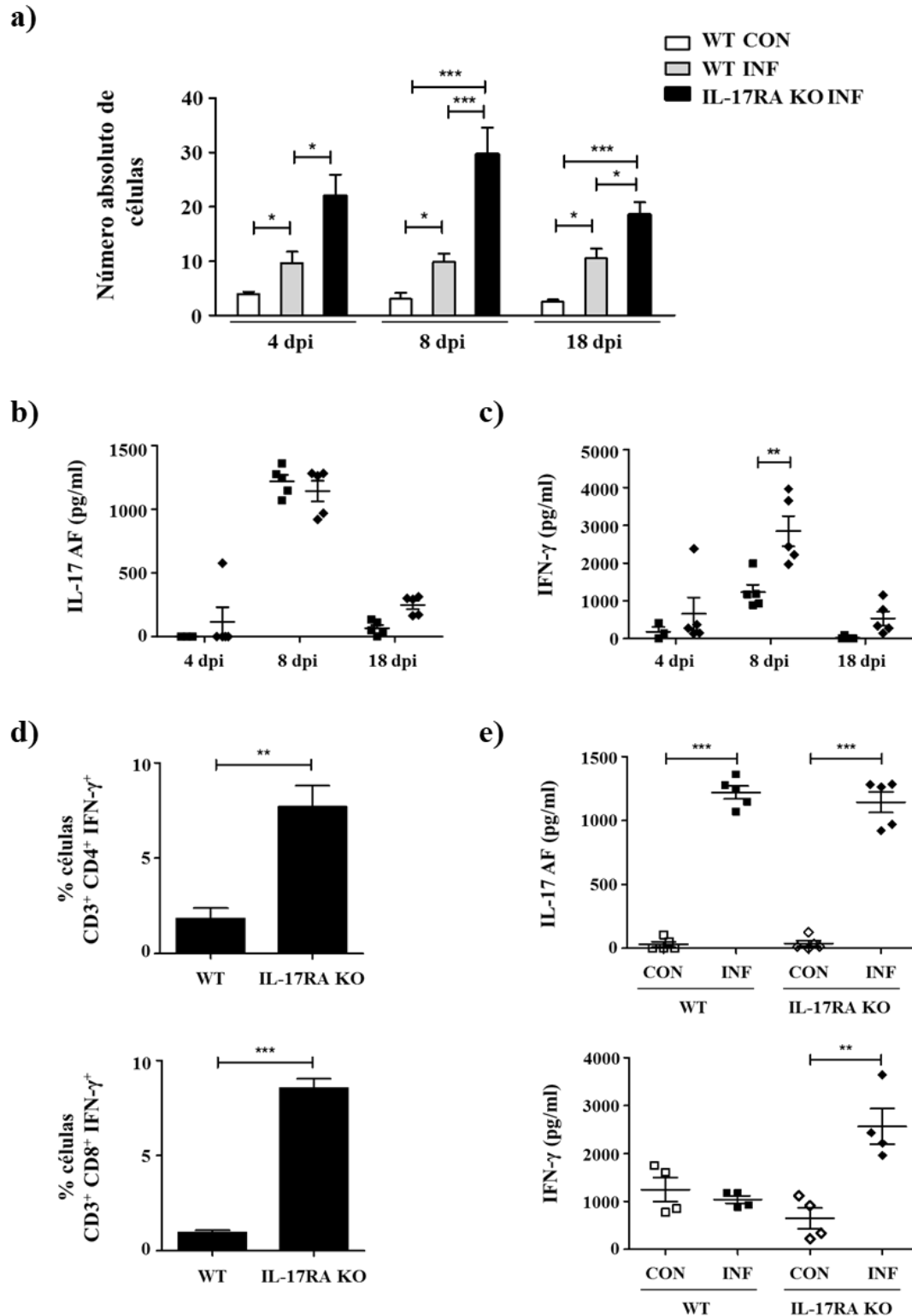
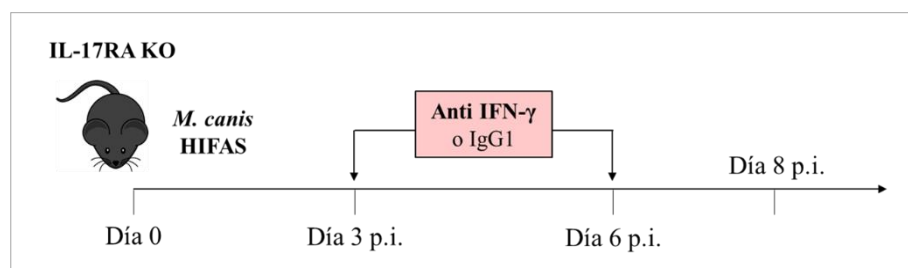


Figura 19. (a) Número absoluto de células de ganglios linfáticos drenantes de piel de ratones WT sin infectar (control) y de ratones WT e IL-17RA KO infectados con *M. canis* a los días 4, 8 y 18 p.i., * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$. (b) Producción de IL-17AF e (c) IFN- γ en el sobrenadante de cultivos de células de ganglios linfáticos drenantes de piel de ratones WT (■) e IL-17RA KO (◆) infectados con *M. canis* a los días 4, 8 y 18 p.i., re-estimuladas con HKMc por 48 hs, ** $p < 0,01$. (d)

Porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ (con previa selección de la población CD3⁺) productoras de IFN- γ de ganglios drenantes de piel re-estimuladas con HKMc por 48 hs. **p<0,01, ***p<0,0004. (e) Producción de IL-17AF e IFN- γ en el sobrenadante de cultivos de células de ganglios linfáticos drenantes de piel de ratones WT control (□) o infectado (■) y ratones IL-17RA KO control (◇) o infectado (◆) por 8 días, y re-estimuladas con HKMc por 48 hs., **p< 0,005, ***p<0,0001.

Considerando que el aumento de IFN- γ podría estar relacionado con la mayor inflamación en la piel de los ratones IL-17RA KO, se evaluó el infiltrado de neutrófilos y la producción de citoquinas en la epidermis en ratones IL-17RA KO tratados con un anticuerpo bloqueante de IFN- γ , una vez establecida la infección según se detalla en el **Esquema 3**.



Esquema 3. Esquema de inyección del anticuerpo monoclonal bloqueante de IFN- γ , o control de isotipo IgG1, a los días 3 y 6 post-infección en ratones IL-17RA KO. Los animales fueron inyectados vía i.p. El mismo esquema se utilizó para los controles en ratones WT.

La **Figura 20** muestra que los ratones IL-17RA KO tratados con el anticuerpo bloqueante de IFN- γ presentaron un menor infiltrado de neutrófilos (p<0,0001) (**Figura 20a**) y menores niveles de producción de TNF por la células epidérmicas (p<0,0001), con respecto a los animales IL-17RA KO tratados con el control de isotipo (**Figura 20b**). Sorprendentemente, los ratones IL-17RA KO tratados con anti-IFN- γ mostraron una disminución significativa de la carga fúngica por cuantificación de UFC en la piel, respecto a los ratones IL-17RA KO tratados con el control de isotipo (**Figura 20c y d**). Sin embargo, los ratones IL-17RA KO tratados con anti-IFN- γ mostraron una tendencia de una carga fúngica mayor que los ratones WT infectados, lo cual se puede observar en la cuantificación de UFC en epidermis y, también, en los cortes histológicos de piel (**Figura 20d**). En ninguno de los grupos estudiados se observó diseminación a dermis u órganos profundos (análisis histopatológico y cultivos en agar Sabouraud, datos no mostrados). También se observó que la producción de IFN- γ bloquea la secreción de IL-10 por las células epidérmicas (**Figura 20e**). Por el contrario, el bloqueo de IFN- γ en los

ratones IL-17RA KO, promovió el aumento en la secreción de citoquinas relacionadas con la respuesta tipo 17, como IL-17AF, IL-23, IL-22, IL-1 β e IL-6 (**Figura 20e**). El aumento de estas citoquinas, en ausencia de señalización vía IL-17RA e IFN- γ , podría explicar el efecto protector frente a *M. canis* evidenciado por la disminución de la carga fúngica en la epidermis.

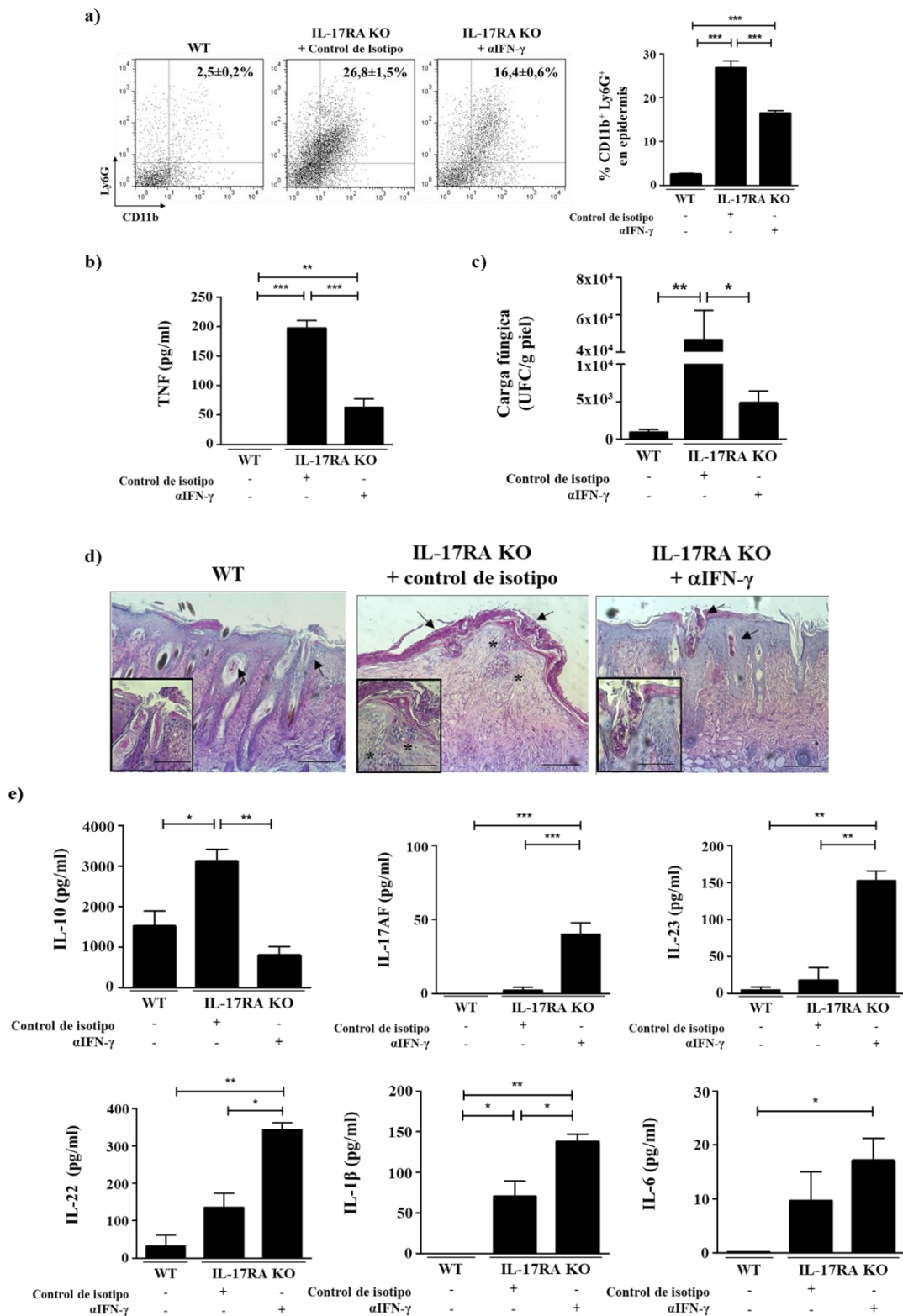


Figura 20. a) Población Ly6G⁺CD11b⁺, y cuantificación (**p<0,0001), dentro de células epidérmicas de piel del lomo de ratones WT e IL-17RA KO infectados y tratados con anticuerpo bloqueante de IFN-γ o control de isotipo (**b**) Producción de TNF (**p<0,001, ***p<0,0001) en

el sobrenadante en células epidérmicas de piel del lomo de ratones WT e IL-17RA KO infectados y tratados con anticuerpo bloqueante de IFN- γ o control de isotipo. Día 8 p.i, luego de 5 horas de re-estímulo con PMA **(c)** Carga fúngica y **(d)** cortes histológicos de la piel de ratones WT e IL-17RA KO infectados y tratados con anticuerpo bloqueante de IFN- γ o control de isotipo (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$ **(e)** producción de IL-10 (* $p < 0,01$, ** $p < 0,002$), IL-17AF (** $p < 0,0002$), IL-23 (** $p < 0,001$), IL-22 (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$), IL-1 β (* $p < 0,1$, ** $p < 0,001$) e IL-6 (* $p < 0,02$) en el sobrenadante de células epidérmicas de piel del lomo de ratones WT e IL-17RA KO infectados y tratados con anticuerpo bloqueante de IFN- γ o control de isotipo. Día 8 p.i, luego de 5 horas de re-estímulo con PMA.

Por lo tanto, en ausencia de la señalización de IL-17, hay un aumento en la producción de IFN- γ que contribuye al reclutamiento de neutrófilos y producción de TNF e IL-10 en la piel durante la infección. Sin embargo, en ausencia de IL-17, IFN- γ también favorece la proliferación del hongo en la piel, probablemente mediante la inhibición de citoquinas protectoras de la respuesta tipo 17 relacionadas a la respuesta inmune innata.

4.2.5. IL-17A controla la infección superficial y la respuesta Th1 en la infección por *M. canis*.

Considerando que la dermatofitosis en los ratones IL-17RA KO permitió evaluar los efectos de la señalización de las citoquinas IL-17A, IL-17C, IL-17E, IL-17F (Gaffen 2009) en la evolución de la infección, el próximo objetivo fue estudiar la dermatofitosis experimental en ratones deficientes de los genes codificantes para IL-17A e IL-17F (IL-17A/F KO) (Haas 2012).

Similarmente a lo observado en los ratones IL-17RA KO, los ratones IL-17A/F KO presentaron lesiones en placa, húmedas y exacerbadas, con respecto a la infección en los ratones WT para el día 8 p.i. (**Figura 21a**). Además, en concordancia con el análisis histopatológico de la piel de los animales IL-17RA KO, se observó una elevada carga fúngica con hifas tanto en la superficie de la epidermis como en los folículos pilosos, junto con un intenso infiltrado de neutrófilos (**Figura 21b y c**). También se observó la presencia de neutrófilos formando microabscesos alrededor de las hifas de *M. canis* como en la infección en ratones WT e IL-17RA KO (**Figura 21b y c**).

Para evaluar la respuesta adaptativa, el análisis de la producción de citoquinas por células de ganglios linfáticos drenantes de piel demostró que, en ausencia de IL-17A/F, también hubo un aumento significativo de IFN- γ ($p < 0,01$) al día 8 p.i. (**Figura 21d**). Además,

como era de esperar, no se detectó producción de IL-17AF en los ratones IL-17AF KO (**Figura 21e**).

Estos resultados confirman la participación de las citoquinas IL-17 en el control de la infección y de la inflamación, y establecen el rol específico de IL-17A e IL-17F. Con respecto a esto, es muy probable que estos fenómenos sean mediados principalmente por IL-17A ya que se observó que los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ sólo producen IL-17A (**Figura 14c**) y no se detectó IL-17F en los análisis por citometría de flujo de las células de ganglios drenantes de piel durante la infección (datos no mostrados).

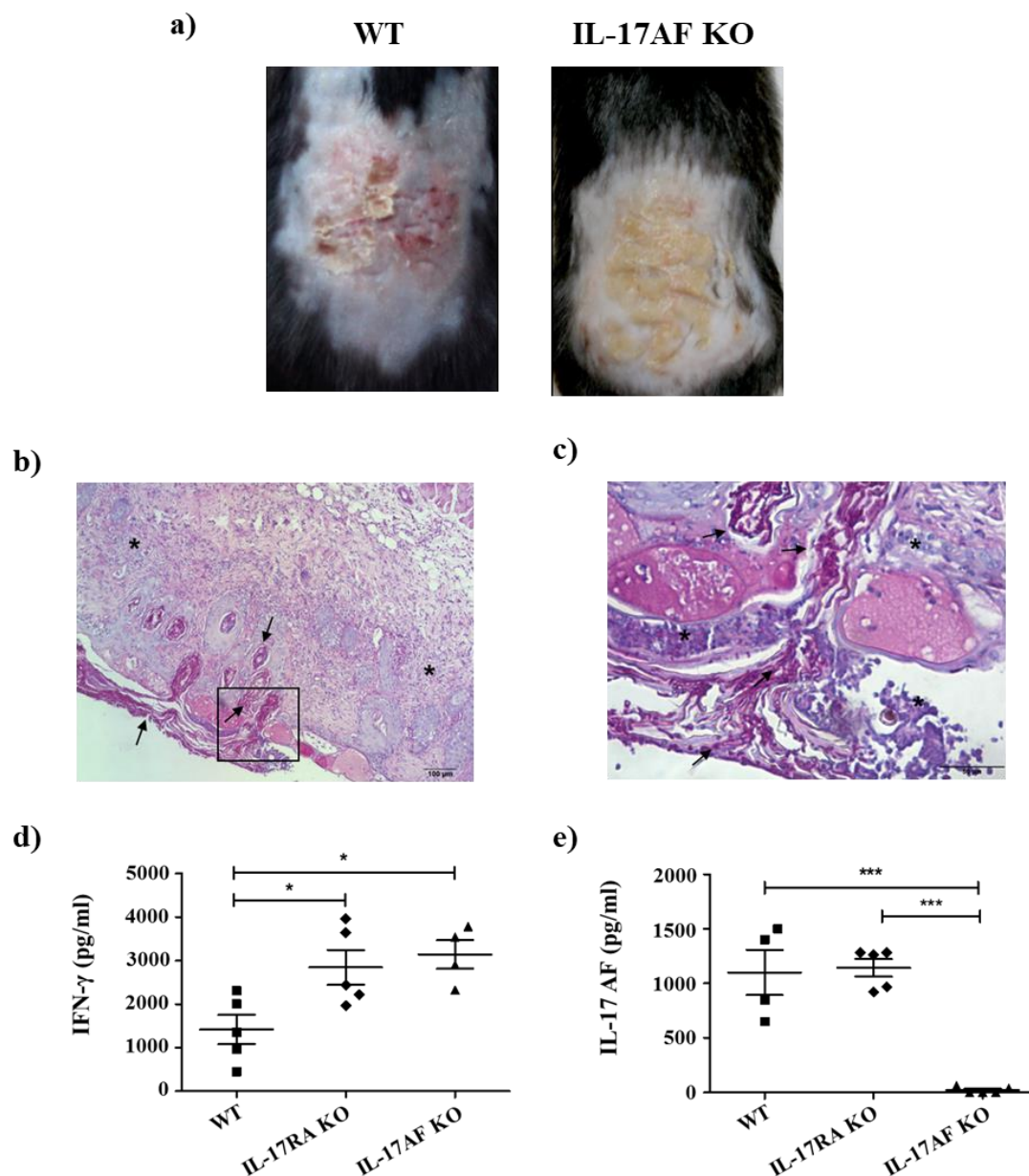


Figura 21. (a) Lesiones en el lomo de ratones C57BL/6 (WT) o ratones IL-17AF KO infectados con *M. canis* al día 8 p.i. (b) Cortes histológico de biopsia de piel del lomo de ratones IL-17AF KO al día 8 p.i., infiltrado inflamatorio indicado con asteriscos e hifas PAS+ indicadas con flechas

(100x). **(c)** Ampliación (400x) de la zona marcada en (b). Hifas PAS+ indicadas con flechas, infiltrado inflamatorio indicado con asteriscos. **(d)** Producción de IFN- γ e **(e)** IL-17AF en el sobrenadante de cultivos de células de ganglios linfáticos drenantes de piel de ratones WT (■), IL-17RA KO (◆) e IL-17AF KO (▲) infectados con *M. canis* al día 8 p.i., re-estimuladas con HKMc por 48 hs. * $p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

En conclusión, estos resultados demuestran que IL-17A tiene una doble función durante la dermatofitosis con *M. canis*: inhibe la proliferación fúngica en la epidermis y regula una inflamación cutánea mediada por IFN- γ . En ausencia de IL-17, la desregulación en la producción de IFN- γ , aunque contribuye al reclutamiento de neutrófilos y la producción de TNF en la piel, paradójicamente favorece la infección cutánea e inhibe la producción de citoquinas asociadas a la respuesta mediada por IL-17.

Objetivo Específico II – Conclusiones

- El modelo de infección epicutánea con *M. canis* en ratones C57BL/6 es una infección reproducible con características clínicas e histopatológicas similares a la *tinea capitis* no inflamatoria.
- Este modelo se caracteriza por:
 - Infección fúngica restringida en la epidermis, con presencia de hifas en la capa córnea e invadiendo folículos pilosos
 - Proliferación epidérmica e infiltración de neutrófilos con la formación de microabscesos alrededor de las hifas.
 - Infección dermatofítica del pelo de forma ectotrix.
- La señalización de la vía IL-17/IL-17R es necesaria para suprimir la proliferación fúngica en la piel y para controlar la respuesta inflamatoria exacerbada. La dermatofitosis en los ratones deficientes en la inmunidad mediada por IL-17 se asemeja a la *tinea capitis* inflamatoria en humanos.
- En la dermatofitosis, el reclutamiento de neutrófilos en la piel y su funcionalidad no dependen de un efecto directo de la señalización vía IL-17.
- La inmunidad mediada por IL-17A inhibe la producción de IFN- γ en ganglios linfáticos drenantes de piel. En ausencia de señalización de citoquinas IL-17, IFN- γ promueve la producción de TNF e IL-10 y hay un mayor reclutamiento de neutrófilos en la epidermis. Sin embargo, en este contexto, IFN- γ favorece la infección superficial probablemente por inhibición de citoquinas de la inmunidad innata asociadas a la respuesta tipo 17.
- Ante la falta de la señalización IL-17/IL-17R, los ratones controlan la infección dermatofítica, pero a expensas de un mayor daño en el tejido infectado.

4.3. Objetivo Específico III: Determinar el rol *in vivo* de las células de Langerhans en la respuesta inmune frente a *M. canis*.

Luego de demostrar que *M. canis* induce una respuesta Th17 tanto *in vitro* como *in vivo*, se estudió el rol de las células de Langerhans en la inducción de la inmunidad mediada por IL-17 durante la infección.

Para ello, se desarrolló el modelo de dermatofitosis en ratones Lang-EGFPDTR que permite la depleción condicional de las células de Langerhans, luego del tratamiento con toxina diftérica. En estos ratones, todas las células Langerina⁺ co-expresan el receptor de la toxina diftérica (DTR) y la proteína fluorescente verde (EGFP) (Kissenpfennig 2005).

4.3.1. Las células de Langerhans contribuyen a la inducción del perfil Th17 durante la dermatofitosis experimental.

En primer lugar, se estandarizó la depleción de células de Langerhans en los ratones Lang-EGDPDTR mediante la inyección de toxina diftérica (DT) vía intraperitoneal. A las 24 horas, se obtuvieron secciones de las orejas de animales tratados (Lang-EGFPDTR + DT) y sin tratar (Lang-EGFPDTR) con toxina diftérica, para la visualización en el microscopio de fluorescencia. La **Figura 22**, muestra que el tratamiento con toxina diftérica eliminó las células de Langerhans (EGFP⁺) de la epidermis y también las células que expresan langerina de la dermis (**Figura 22b**).

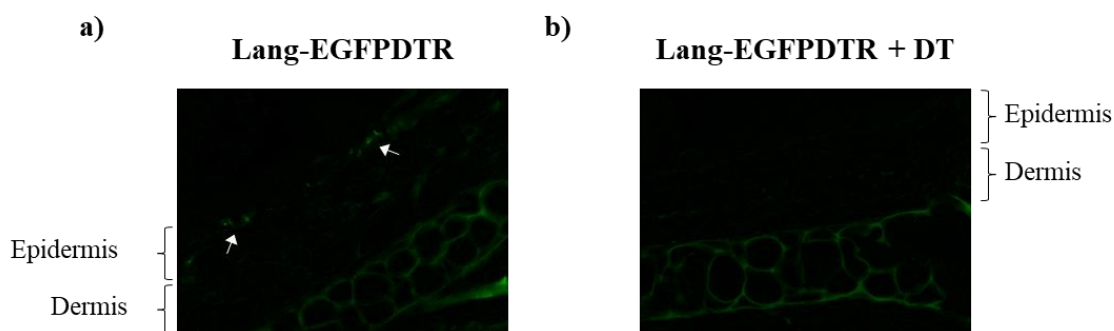
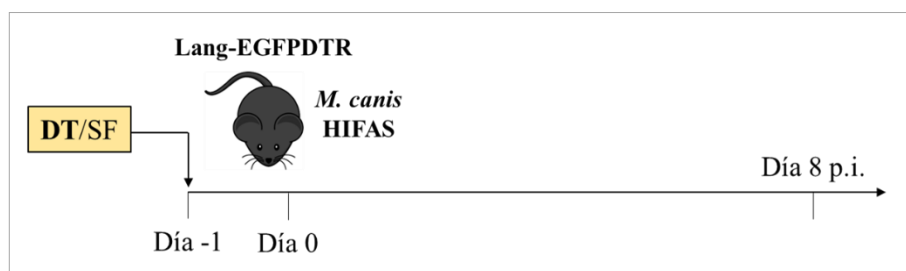


Figura 22. Microscopía de fluorescencia de cortes de piel de orejas de ratones Lang-EGFPDTR. (a) sin tratar (LC: EGFP⁺, indicadas con flechas) y (b) tratados con toxina diftérica (DT) por vía intraperitoneal luego de 24 hs.

Por lo tanto, se realizó el siguiente esquema experimental, el cual permitió evaluar la evolución de la infección en ausencia de células que expresan langerina (**Esquema 4**).

Para descartar posibles efectos adversos de la toxina diftérica, ratones WT recibieron el mismo tratamiento que los ratones Lang-EGFPDTR.



Esquema 4. Esquema de depleción de células Langerina⁺ e infección con *M. canis* en ratones Lang-EGFPDTR. Los animales fueron inyectados vía i.p. con solución fisiológica (SF) o toxina diftérica (DT) y luego de 24 hs, se infectaron vía epicutánea con *M. canis*. El mismo esquema se utilizó para los controles en ratones WT.

En la **Figura 23**, el análisis por citometría de flujo de las células de los ganglios linfáticos drenantes de piel, re-estimuladas con HKMc, demostró que en ausencia de células de Langerhans (ratones Lang-EGFPDTR + DT) se observa una disminución en el porcentaje de células CD3⁺IL-17A⁺, con respecto a los controles a los 8 días p.i. (**Figura 23a**). Específicamente, se evidenció la disminución de la población de linfocitos T CD4⁺ productores de IL-17A ($p < 0,05$, con respecto a ratones WT infectados) (**Figura 23b**). Además, se observó una tendencia de menor producción de IL-17 en los sobrenadantes de cultivos (**Figura 23c**). No se observaron diferencias significativas en la producción de IL-17A en los ratones WT inyectados con la toxina diftérica o ratones Lang-EGFPDTR tratados con solución fisiológica, a los 8 días p.i. (**Figura 23c**).

Además, coincidiendo con los resultados que demuestran que en ausencia de señalización de IL-17 hay una elevada producción de IFN- γ en los ganglios linfáticos drenantes de piel de los animales infectados, se observó que, luego de 8 días post-infección, en los ratones depletados de LC (Lang-EGFPDTR + DT) también hay una tendencia de niveles incrementados de IFN- γ en los sobrenadantes de los cultivos de las células de ganglios estimuladas con HKMc, respecto a los controles competentes en LC (Lang-EGFPDTR + SF o WT) (**Figura 23d**). Además, en los ratones depletados de LC se observa que la producción de IFN- γ antígeno-específica (re-estimulación con HKMc) es significativamente mayor que las células sin estímulo. Por el contrario, no hubo diferencias significativas en la producción de IFN- γ en los ratones competentes de LC (**Figura 23d**).

Estos resultados confirman lo observado en los experimentos *in vitro*, demostrando que las LC participan en la inducción del perfil Th17 en la dermatofitosis por *M. canis*.

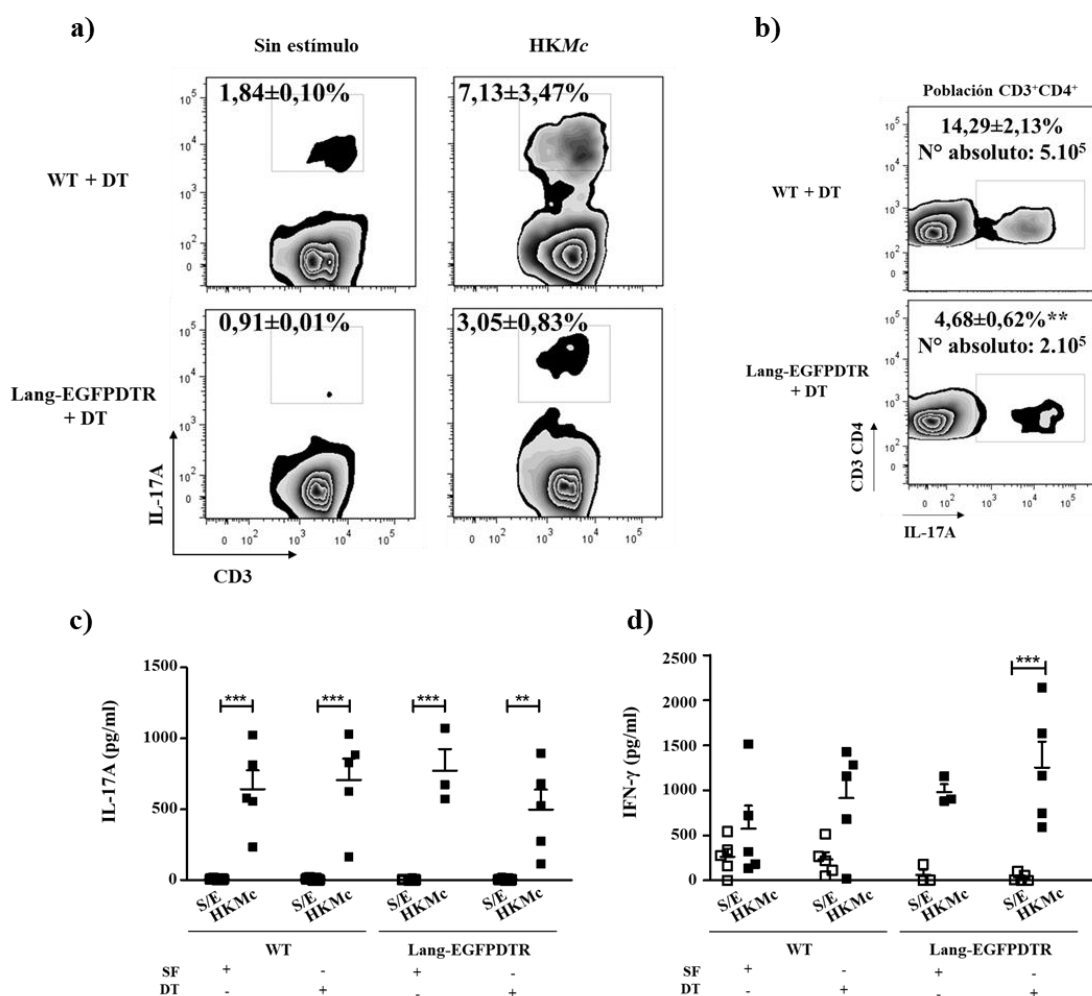


Figura 23. (a) Porcentaje de células CD3⁺ productoras de IL-17A de ganglios drenantes de piel de ratones infectados con *M. canis* WT (competentes en LC) o depletados de LC (Lang-EGFPDTR + DT), sin estímulo o re-estimuladas con HKMc por 48 hs. (b) Porcentaje y número absoluto de células CD4⁺ (con selección previa de la población CD3⁺) productoras de IL-17A en ganglios drenantes de piel de ratones infectados con *M. canis* WT (competentes en LC) o depletados de LC (Lang-EGFPDTR + DT), sin estímulo o re-estimuladas con HKMc por 48 hs, **p<0,002. (c) Producción de IL-17AF e (d) IFN-γ en el sobrenadante de cultivos de células de ganglios linfáticos drenantes de piel, re-estimuladas con HKMc por 48 hs, de ratones WT sin tratar (SF) o tratados con DT y ratones Lang-EGFPDTR sin tratar (SF) o tratados con DT, ***p<0,001.

Por otra parte, considerando que, en el contexto de la dermatofitosis, IL-17A controla la invasión de *M. canis* en la epidermis y la inflamación cutánea, se investigaron las

características histopatológicas de las lesiones y la diseminación fúngica extra-cutánea en los ratones depletados de LC. Sorprendentemente, las lesiones en la piel de los ratones Lang-EGFPDTR (con o sin DT) fueron similares a los ratones WT, a los 8 días p.i. (**Figura 24a**). Además, si bien se observó una mayor frecuencia de folículos pilosos infectados y alteraciones en la estructura epidérmica (**Figura 24b y c**), la invasión fúngica observada en la epidermis con ausencia de LC fue mucho menor a que en los ratones deficientes en el eje IL-17/IL-17R (IL-17RA KO e IL-17A/F KO, **Figura 16, Figura 21b y c**, respectivamente). Finalmente, no hubo diseminación extra-cutánea ya que no se observó la presencia del hongo en cultivos en agar Sabouraud de ganglios drenantes de piel, riñón, hígado, cerebro y bazo provenientes de los distintos grupos de animales infectados (datos no mostrados).

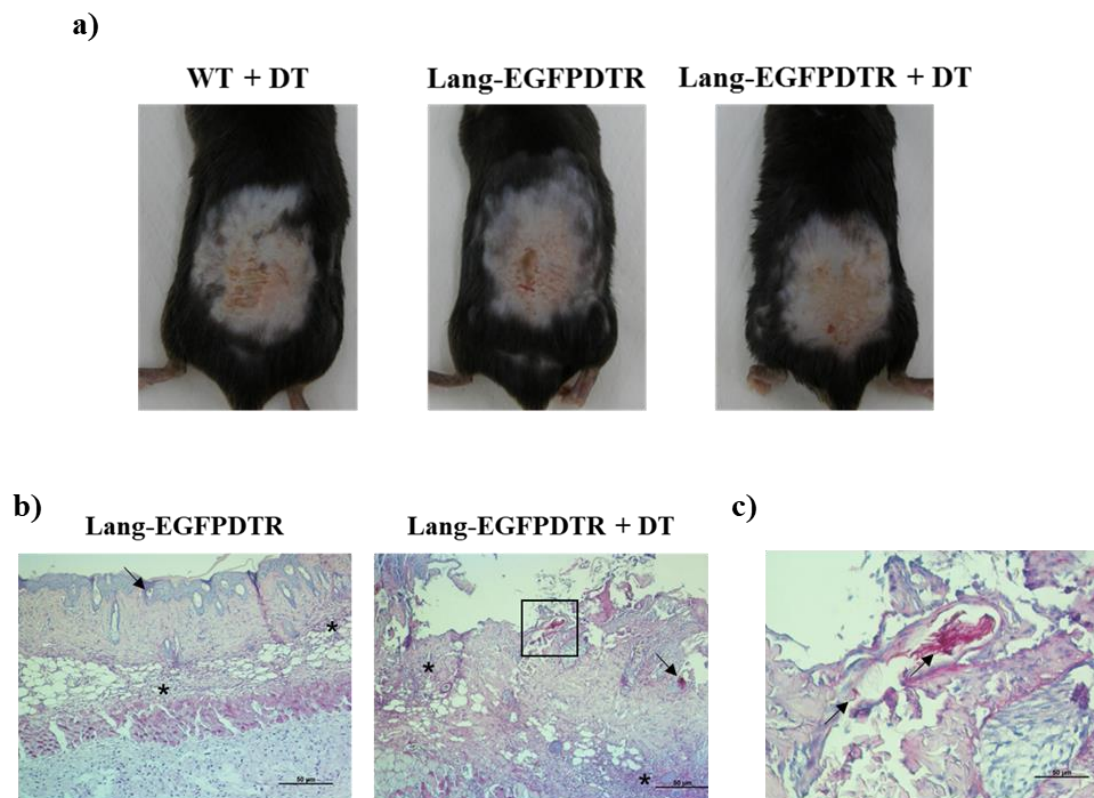


Figura 24. (a) Lesiones en el lomo de ratones WT tratados con DT o ratones Lang-EGFPDTR sin tratar o tratados con DT e infectados con *M. canis*, al día 8 p.i. (b) Cortes histológicos de biopsias de piel del lomo al día 8 p.i. de ratones Lang-EGFPDTR competentes de LC (Lang-EGFPDTR) o depletados de LC (Lang-EGFPDTR + DT). Hifas PAS+ indicadas con flechas e infiltrado inflamatorio indicado con asteriscos (100x) (c) Ampliación (400x) de la zona marcada en (b) al día 8 p.i., hifas PAS+ indicadas con flechas.

Objetivo Específico III – Conclusiones

- En ausencia de células de Langerhans, hay una disminución en la producción de IL-17A y un aumento en la producción IFN- γ por células T CD4⁺ antígeno-específicas de ganglios linfáticos drenantes de piel, luego de la infección con *M. canis*.
- Los ratones deficientes en LC y los ratones competentes en LC presentaron una invasión fúngica y lesiones cutáneas similares en la piel. La invasión fúngica en ausencia de LC fue mucho menor a la observada en los ratones deficientes en el eje IL-17/IL-17R.
- Las lesiones dermatofíticas en la piel de los ratones depletados de LC, fueron similares a las observadas en los ratones WT infectados.
- No hubo diseminación extra-cutánea en los ratones deficientes de LC.

Capítulo 5: Discusión

Esta tesis es el primer estudio de la inmunidad mediada por IL-17 durante la infección por dermatofitos *in vivo*. Mediante el desarrollo de un modelo experimental de infección superficial con el patógeno humano *Microsporum canis*, se ha demostrado que la citoquina IL-17 puede prevenir la proliferación fúngica en la piel y modular una respuesta inflamatoria exacerbada mediada por una respuesta tipo Th1. En ausencia de IL-17, el aumento de IFN- γ favorece la infección dermatofítica posiblemente al inhibir citoquinas asociadas a la respuesta tipo 17, tales como IL-22, IL-1 β , IL-23 e IL-6. Además, se ha demostrado que *M. canis* activa a las células de Langerhans, las cuales participan en la inducción de la respuesta Th17 observada en la infección.

Las células de Langerhans son células dendríticas localizadas en la epidermis, la cual es la zona de la piel donde invaden los dermatofitos. Alteraciones en la función de barrera de la piel activan a las LC para inducir una respuesta inmune específica (Doebel 2017). Por lo tanto, como primera medida se estudiaron los efectos de las hifas de *M. canis* sobre la activación, maduración y presentación antigénica de las células de Langerhans murinas.

Se determinó que las hifas de *M. canis* activan a las células XS106, línea celular de LC murinas (Timares 1998, Takashima 2001), demostrado por el aumento en la expresión de MHC-II y de las moléculas co-estimuladoras CD40 y CD80, las cuales participan en la presentación antigénica (**Figura 8**). Estos hallazgos indican que las células XS106 son capaces de reconocer al hongo, posiblemente de forma directa luego de la interacción de estructuras de la pared celular con receptores innatos en las LC o luego de sensar productos secretados por el metabolismo fúngico (Monod 2008, de Jong 2010, Baldo 2011). Además, las células XS106 pre-activadas con *M. canis* fueron capaces de diferenciar linfocitos T vírgenes a un perfil Th17, evidenciado por la estimulación de la proliferación de células mononucleares alogénicas con aumento significativo en la producción de IL-17A/F (**Figura 8c y d**). Coincidentemente, las células XS106 incubadas con el hongo mostraron un aumento en la producción de citoquinas, particularmente con producción de IL-6 e IL-23 (**Figura 8b**), las cuales son citoquinas inductoras de las respuestas Th17 (Hirota 2012). Para profundizar los resultados sobre la activación de las LC y, considerando que estas células se encuentran en íntimo contacto con los queratinocitos y con otras células epidérmicas (Kabashima 2016), se estudió la activación de las LC frente a *M. canis* en explantes de epidermis obtenidos de orejas de ratones C57BL/6 (**Esquema 1 y Figura 9**). Esta estrategia experimental permite estudiar la activación de las LC en el microambiente de la epidermis, el cual también se encuentra

modificado por la presencia del hongo durante la dermatofitosis. Además, en estos cultivos de epidermis, las LC activadas son capaces de migrar al medio de cultivo, de forma análoga a la migración a los ganglios linfáticos de piel (Ortner 1996, Stoitzner 2010). Similarmente a lo observado con la línea celular XS106, las hifas vivas de *M. canis* activaron a las LC promoviendo la expresión de moléculas MCH-II y co-estimuladoras como también la producción de IL-6. Además, se observó que las células epidérmicas MCH-II negativas (probablemente queratinocitos) también producen IL-6 en presencia de *M. canis* (**Figura 9f y g**). Estos resultados permiten concluir que las LC, dentro de la epidermis, son capaces de detectar al hongo y adquirir un fenotipo de célula madura, relacionado con la presentación antigénica y la migración a ganglios linfáticos drenantes (Doebel 2017). De manera análoga y confirmando los resultados de citometría de flujo, las hifas de *M. canis* también indujeron un aumento en la producción de IL-6, IL-23 e IL-1 β en los sobrenadantes de los cultivos de los explantes de epidermis (**Figura 9h**). Claramente, las hifas vivas de *M. canis* inducen un ambiente en la epidermis que estimula la producción de citoquinas claves para la inducción de la respuesta Th17. En este sentido, la presencia de IL-6 ha sido demostrada como suficiente para inducir la diferenciación Th17 por las LC durante la infección experimental epicutánea con la levadura *C. albicans* (Kashem 2015) y la presencia de esta citoquina, junto con IL-1 β , fueron reportadas como necesarias para la diferenciación a Th17 en el tejido cutáneo (Hu 2011). Apoyando a esta respuesta, el aumento en la secreción de IL-23 podría estar relacionado con la estabilización y mantenimiento de la respuesta Th17 (McGeachy 2009). Posiblemente, estas citoquinas sean producidas por los queratinocitos dado que representan la población celular más abundante de la epidermis (Nestle 2009). Los queratinocitos poseen receptores que podrían reconocer estructuras fúngicas, como TLR, NLR o CLR, que gatillen la producción de citoquinas pro-inflamatorias (Cho 2010). Además, estudios previos demuestran que los dermatofitos inducen la producción de citoquinas directamente en cultivos de queratinocitos humanos y que distintas especies de dermatofitos tienen diferentes capacidades para estimular la activación de los queratinocitos (Tani 2007, Ogawa 2010, Achterman 2015). Por lo tanto, frente al contacto con hifas vivas de *M. canis* hay una producción de citoquinas inductoras de la respuesta Th17 por parte de las LC y el microambiente de la epidermis. En concordancia con estos resultados y los obtenidos con la línea celular XS106, las LC purificadas de los cultivos de epidermis con *M. canis*, tuvieron la capacidad de estimular la proliferación y diferenciación de células mononucleares alogénicas hacia un perfil Th17 (**Figura 10**).

El reconocimiento de un microorganismo por receptores de la inmunidad innata depende de la exposición de determinados patrones moleculares asociados a patógenos en la pared celular de los hongos (β -glucanos, mananos, quitinas) o de factores de virulencia secretados durante la infección (por ejemplo, proteasas) (Monod 2008, Baldo 2011, Erwig 2016). La inactivación de un hongo con calor puede cambiar la exposición de estructuras de la pared o inhibir la secreción de productos de su metabolismo (Mao 2014). Los resultados muestran que las LC purificadas de cultivos de epidermis con el hongo vivo o con el hongo muerto por calor inducen la proliferación de linfocitos vírgenes (**Figura 10a**), sin embargo, sólo LC pre-activadas con las hifas vivas de *M. canis* estimularon la síntesis de IL-17 por linfocitos alogénicos (**Figura 10b**). Por el contrario, las LC pre-activadas con hifas muertas por calor mostraron una tendencia a aumentar la producción de la citoquina inmunosupresora IL-10. Estos efectos supresores ya se habían observado con antígenos presentes en otros dermatofitos como *Trichophyton rubrum* (Blake 1991, Dahl 1993). Además, una observación similar fue reportada por Mao *et al.*, quien mostró que el tratamiento de *M. canis* con calor suprimía la activación pro-inflamatoria de monocitos humanos THP-1 (Mao 2014) y también por Achterman *et al.* en un tejido de epidermis comercial, en el cual artroconidias de dermatofitos muertas por calor fallaron en causar la invasión del tejido y el estado pro-inflamatorio en la piel (Achterman 2015). Estos resultados permiten sospechar que los factores de virulencia podrían ser productos de secreción o estructuras de la pared del hongo que se exponen solamente en el hongo vivo. En este sentido, el grupo de Mignon *et al.* ha estudiado diferentes enzimas de *M. canis* en un modelo *ex vivo* de epidermis felina y en dermatofitosis experimental en cobayos. Aunque se reportó que las proteasas, SUB3, DppV y MEP3, cumplen una función en facilitar la adherencia del hongo a la capa córnea de la epidermis, no se demostró la participación de estas proteasas en la invasión del tejido o en la generación de una respuesta protectora (Baldo 2009, Vermout 2003, Vermout 2008).

Por otra parte, los efectos de *M. canis* en las LC podrían ser la consecuencia de la interacción de β -glucanos o α -mananos de la pared celular con receptores de la inmunidad innata como lectinas tipo C (Dectina-1, Dectina-2, MINCLE) o TLR, tal como se ha demostrado que ocurre con diferentes hongos patógenos (Lionakis 2017). En este sentido, en la dermatofitosis humana se observa un aumento en la expresión de TLR-2 y TLR-4 en biopsias de piel, sugiriendo la participación de estos receptores durante la infección (Brasch 2014). Por otra parte, se ha demostrado que Dectina-2 soluble se une a la pared celular de *Microsporium audouinii* (Sato 2006) y que células dendríticas murinas unen

hifas de *T. rubrum* y *M. audouinii* por la interacción con una glicoproteína de transmembrana denominada DC-HIL (Chung 2009). Además, se ha reportado que *M. canis* promueve la producción de IL-1 β mediante la activación del NLRP3-inflamosoma y la participación de Dectina-1, en macrófagos y células dendríticas murinas (Mao 2014). Sin embargo, en este trabajo de tesis, se observó que ratones deficientes en Dectina-1 (Dectin-1 KO) (Taylor 2006) no mostraron diferencias en la susceptibilidad a la infección o en la respuesta inmune antifúngica respecto a los ratones WT, durante la infección epicutánea con *M. canis* (datos no mostrados). Por lo tanto, una perspectiva de esta tesis es identificar los mecanismos de reconocimiento de *M. canis* en la piel y las moléculas fúngicas involucradas en la inducción de la respuesta inmune, desarrollando experimentos enfocados en la exposición de los polisacáridos de la pared celular o de factores de virulencia secretados por el hongo (Monod 2008).

Esta tesis demuestra por primera vez los efectos de un dermatofito sobre la activación de células dendríticas epidérmicas y su capacidad para estimular la producción de IL-17A/F por linfocitos alogénicos. Estos datos apoyan los estudios iniciales publicados por Braathen y Kaaman (Braathen 1983), que demostraron que las LC purificadas de individuos sensibilizados con tricoftina (un antígeno del dermatofito *T. rubrum*) promovían, *in vitro*, la proliferación de linfocitos T de sangre periférica aislados del mismo paciente, sugiriendo que las LC tienen una función central en la inducción de la inmunidad específica anti-dermatofítica. Además, en línea con estos resultados, las LC también inducen exclusivamente una respuesta Th17 en un modelo de candidiasis cutánea (Igyártó 2011, Kashem 2015) e inician la respuesta de IL-17 en un modelo de infección de la piel con *Staphylococcus aureus* (Conti 2009, Cho 2010, Kobayashi 2015). Estos hallazgos refuerzan las evidencias que demuestran que las LC inician la inmunidad específica Th17 luego de que patógenos induzcan la ruptura del estrato córneo de la piel (Igyártó 2011, Doebel 2017).

Para poder estudiar si los fenómenos observados *in vitro* eran biológicamente relevantes *in vivo*, era necesario desarrollar un modelo murino de infección superficial con *M. canis*. Por lo tanto, se estableció un modelo experimental de dermatofitosis epicutánea con hifas de *Microsporium canis* en ratones wild-type C57BL/6 (**Esquema 2**). En este modelo, la infección se realizó utilizando la forma infectante de los dermatofitos (hifas) (Hashimoto 1991) por vía epicutánea, o transcutánea, que permite el contacto directo del hongo con la epidermis, tal como sucede en la infección natural (Brasch 2008, Combadiere 2011, Nicolas 2008).

En primera instancia, se caracterizó la cinética de la evolución de la infección a diferentes puntos de tiempo: días 4, 8 y 18 post-infección. Se observó que los ratones C57BL/6 infectados desarrollaron lesiones en la piel limitadas a la epidermis desde el día 4, con un pico a los 8 días post-infección y que resolvieron para el día 18 (**Figura 11 y Tabla 2**). A su vez, se hizo un seguimiento hasta el día 45 y no se observó la recurrencia de la infección. Tal como se observa en la dermatofitosis en individuos inmunocompetentes, los ratones C57BL/6 infectados con *M. canis* presentaron lesiones leves a moderadas con presencia de descamación, eritema, acantosis e infiltrado inflamatorio, constituido principalmente por neutrófilos, en la epidermis y dermis (**Figura 12, Figura 13a y Tabla 2**). Además, se observaron hifas penetrando en el estrato córneo e invadiendo los folículos pilosos y los pelos de forma ectotrix (**Figura 12b, c y d**). Coincidiendo con lo observado en los cortes histológicos de piel, la determinación de la carga fúngica en la epidermis demostró la detección de colonias fúngicas al día 4 y 8 post-infección (**Figura 17b**). Todas estas manifestaciones clínicas son similares a las observadas en la *tinea capitis* no inflamatoria o seca en humanos (Hay 2007). Además, coincidiendo con lo demostrado en otros modelos de infección con dermatofitos en ratones y cobayos (Hay 1983, Cambier 2014) y en infecciones en humanos (Szepes 1993, Koga 2005), los neutrófilos infiltrantes se encontraron formando microabscesos epidérmicos alrededor de las hifas. En este sentido, la actividad citotóxica de los neutrófilos y la proliferación epidérmica (acantosis) se han sugerido como mecanismos de expulsión de las hifas que permitirían la eliminación del hongo de la piel (Hay 2007).

En conclusión, el modelo de dermatofitosis epicutánea desarrollado en esta tesis es comparable clínica e histopatológicamente con la infección superficial en humanos, con invasión fúngica limitada a la epidermis. El establecimiento de esta infección experimental es de gran importancia ya que, a diferencia de otros modelos experimentales (Cambier 2017), permite el estudio de la fisiopatogenia y respuesta inmune en dermatofitosis en un sistema con relevancia biológica.

Está ampliamente demostrado que la inmunidad mediada por células T es reconocida como necesaria para la recuperación clínica y la protección frente a la infección con dermatofitos (Calderon 1984, Zahur 2014). Esta respuesta celular también fue importante en modelos experimentales en cobayos y ratones (Rasmussen 1978, Hay 1983, Koga 2005, Jensen 2007, Vermout 2008, Brasch 2009, Fritz 2012, Cambier 2014). Estudios previos reportaron la presencia de células IFN- γ -positivas en lesiones de *tinea corporis* y la producción de esta citoquina en células mononucleares de sangre periférica de

pacientes con dermatofitosis (Koga 1993, Koga 2001, Koga 2001a, Bressani 2013), sugiriendo que la respuesta T helper 1 (Th1) representaría la inmunidad adaptativa celular en estas infecciones. Sin embargo, la respuesta inmune específica montada frente a los dermatofitos no ha sido previamente caracterizada *in vivo* (Heinen 2017). Aunque publicaciones recientes han sugerido la participación de citoquinas de la familia de IL-17 en la protección del huésped durante la dermatofitosis (Alves de Medeiros 2016, Cambier 2014, Lanternier 2013, Nielsen 2015), esta respuesta no ha sido directamente investigada *in vivo* en un sistema biológico relevante. En esta tesis se demuestra, por primera vez, que la respuesta Th17 es la inmunidad adaptativa que predomina en la dermatofitosis, sin producción de otras citoquinas características de las respuestas Th1, Th2 o T regulatoria (**Figura 14b**). La infección aumenta el número de linfocitos en los ganglios drenantes de piel, lo que sugiere la activación de la inmunidad adaptativa (**Figura 14a**). Además, en concordancia con datos previos que demostraban la importancia de los linfocitos T CD4⁺ en la protección del huésped (Calderon 1984), se detectó un mayor porcentaje de células T CD4⁺ productoras de IL-17 que de células T CD8⁺ antígeno-específicas (**Figura 14c**). Apoyando estos resultados, un aumento en la frecuencia de linfocitos Th17 fue hallado en la sangre periférica de un paciente con *tinea capitis* por *M. canis* (Sakuragi 2016). En línea con estos datos, Cambier *et al.* reportaron que los ratones C57BL/6 infectados con dermatofitos zoófilos del género *Arthroderma* sobre-expresan ARN mensajero de TGF- β , IL-1 β e IL-6 en la piel (Cambier 2014), los cuales son mediadores claves de la diferenciación Th17.

Las citoquinas de la familia de IL-17 son esenciales en la inmunología de la piel y las mucosas ya que promueven la movilización de neutrófilos al sitio de infección, regulan la producción de péptidos antimicrobianos (PAM) y mantienen la integridad de la barrera epitelial (Conti 2015). En este estudio, la contribución de la vía de IL-17 en la respuesta protectora frente a la dermatofitosis fue investigada realizando la infección epicutánea con *M. canis* en ratones deficientes en la respuesta IL-17 (IL-17RA KO). Esta cepa murina es deficiente en la subunidad A del receptor de IL-17 y afecta la señalización de la mayoría de los miembros de la familia de IL-17 (IL-17A, IL-17C, IL-17E, IL-17F) (Patel 2015). De acuerdo con lo esperado, los ratones IL-17RA KO fueron más susceptibles a la infección que los ratones WT (**Figura 15**) y mostraron una mayor proliferación del hongo en la capa córnea y los folículos pilosos (**Figura 16**), evidenciado por un aumento significativo en la carga fúngica en la piel, respecto a los ratones WT infectados particularmente al día 8 p.i. (**Figura 17**). Sin embargo, de manera similar a los

ratones WT, en ausencia de la señalización por IL-17RA, la invasión con *M. canis* fue restringida a la epidermis y la infección se resolvió, con una cinética de eliminación del hongo levemente retardada (**Figura 17b** y datos no mostrados). Estos datos demuestran que las citoquinas IL-17 son cruciales para inhibir la colonización superficial de los dermatofitos, pero su ausencia no determina la diseminación fúngica a los tejidos profundos. Esta característica también fue observada en un modelo de candidiasis orofaríngea en ratones IL-17RA KO, en el cual la invasión por *C. albicans* se mantuvo restringida en la epidermis. Estos resultados sugirieron que hay ciertas funciones de barrera de la piel que son independientes de la señalización por IL-17 (Trautwien-Weidner 2015, Sparber 2015).

Por otra parte, los ratones IL-17RA KO infectados con *M. canis* exhibieron exuberantes signos de inflamación, manifestados por un aumento en la producción de citoquinas por las células epidérmicas (**Figura 18f**) y, sorpresivamente, una mayor frecuencia de neutrófilos en la piel y de la quimiocina que recluta neutrófilos CXCL1, comparado con los ratones WT infectados (**Figura 18a y b**). Además, los neutrófilos de la epidermis de los ratones IL-17RA KO fueron funcionalmente similares a los neutrófilos de los ratones WT y se observaron alrededor de las hifas durante la infección (**Figura 18c, d y e**). Estos resultados fueron inesperados ya que, en diferentes modelos infecciosos, la ausencia de IL-17 se correlaciona con una disminución en el reclutamiento de neutrófilos al sitio de infección (Tosello Boari 2012, Chen 2016). Sin embargo, coincidiendo con los datos de esta tesis, Trautwien-Weidner *et al* demostraron que, durante un modelo murino de candidiasis oral, el reclutamiento de neutrófilos a la mucosa fue desacoplado de la vía de IL-17 (Trautwien-Weidner 2015). En otro modelo, la infección en el sistema nervioso central con *Candida tropicalis* promueve el movimiento de neutrófilos mediante la activación de CARD9 (molécula involucrada en la vía de señalización de los CLR) y producción de TNF, de forma independiente de IL-17 (Whibley 2015). En consecuencia, durante la infección de la piel con *M. canis* evidentemente existen mecanismos independientes de IL-17 que median el reclutamiento de neutrófilos a la epidermis. En ausencia de IL-17RA, la infección con *M. canis* induce un incremento significativo de IL-6, TNF y CXCL1 (Figura 18), moléculas quimiotácticas para neutrófilos (Mantovani 2011). Además, otras citoquinas relacionadas con la vía de IL-17 (como IL-22, CXCL2 o IL-1 β) también podrían promover el reclutamiento de neutrófilos (El Malki 2013, Li 2013, Mao 2014, Achterman 2015).

La movilización de neutrófilos a la piel y la secreción de citoquinas observadas en la infección en ausencia de IL-17RA, podrían ser gatilladas directamente debido la alta carga fúngica en los ratones IL-17RA KO, luego del reconocimiento de las hifas de *M. canis*, o sus productos, por las células epidérmicas. Como se discutió previamente, los queratinocitos pueden producir un gran espectro de citoquinas, quimiocinas y PAM frente a la exposición a los dermatofitos, incluyendo los quimioattractantes IL-8 y TNF (Nakamura 2002, Shiraki 2006, Kabashima 2016). Alternativamente, la destrucción del tejido por la invasión del dermatofito podría generar la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMP, según sus siglas en inglés) que promueven la llegada de neutrófilos a la piel.

La presencia de neutrófilos en la piel sugiere que estas células podrían ser importantes para la resolución de la micosis, sin embargo, todavía no se ha demostrado experimentalmente la función de los neutrófilos en la protección durante la infección dermatofítica. Se ha observado *in vitro* que los neutrófilos disminuyen la viabilidad del hongo por diversos mecanismos (Calderón 1987, Calderón 1987a, Heddergott 2012) y que producen citoquinas como TNF, IL-1 β e IL-8 frente al estímulo con artroconidias vivas de *M. canis* (Cambier 2014). Sin embargo, pacientes con deficiencias en la funcionalidad de neutrófilos, como es el caso de la enfermedad granulomatosa crónica (deficiencia en NADPH) o en la deficiencia de mieloperoxidasa, no muestran susceptibilidad a las dermatofitosis. Sólo un reporte ha relacionado un cuadro de dermatofitosis severa en un paciente neutropénico por quimioterapia (Lourdes 2014). Por lo tanto, la infección cutánea con *M. canis* desarrollada en esta tesis representa un modelo experimental que permitiría profundizar en el estudio de la función de los neutrófilos durante la dermatofitosis utilizando, por ejemplo, estrategias de depleción de estas células durante la infección.

Por otra parte, la susceptibilidad a la infección superficial por *M. canis*, en ausencia de señalización por IL-17, podría ser mediada por defectos en la producción de péptidos antimicrobianos (PAM) (Amatya 2017). Con respecto a esto, Trautwien-Weidneer *et al.* observaron que la protección frente a la candidiasis oral fue mediada por la producción de PAM, en un modelo experimental murino (Trautwien-Weidneer 2015). En esta tesis, los PAM podrían llegar a estar involucrados en las defensas antifúngicas, ya que la expresión de β -defensinas, catelicidinas y proteínas S100 en la piel han sido asociadas con los mecanismos protectores de la dermatofitosis humana (Brasch 2014, Jensen 2007, Sawada 2013). A su vez, los PAM pueden tener acción fungicida directa formando poros

en la pared celular, ser quimioattractantes o estimular la secreción de citoquinas (Tomalka 2015, Takahashi 2017). Por lo tanto, para profundizar sobre la función de los PAM en la protección mediada por IL-17, actualmente en nuestro laboratorio se están realizando experimentos para cuantificar los niveles de expresión de ARN mensajero de varios PAM en la piel de ratones WT e IL-17RA KO infectados.

En ausencia de la señalización por IL-17, la histopatología de la piel reveló defectos en la proliferación de las células epidérmicas luego de la infección (**Tabla 2**, número de células de la epidermis). La epidermis de los ratones IL-17RA KO infectados con *M. canis* mostró una ausencia de acantosis evidenciada por el grosor constante de la epidermis durante toda la infección, mientras que los ratones WT, con una respuesta IL-17 funcional, presentaban una marcada acantosis (**Tabla 2 y Figura 16**). En este sentido, IL-17A, IL-17C e IL-17F pueden actuar directamente sobre las células epiteliales, promoviendo la remodelación del tejido y, en particular, IL-17A mantiene la integridad de la barrera de la piel (Cho 2010, Pappu 2012). Por lo tanto, la falta de proliferación observada en la piel podría estar relacionada con la ausencia de señalización de la vía IL-17/IL-17R, lo que contribuiría a la persistencia y proliferación fúngica en el estrato córneo y, en consecuencia, el establecimiento de una inflamación exacerbada (**Figura 16, Tabla 2 y Figura 18f**). Sin embargo, la inflamación exagerada de la piel y el aumento en el influjo de neutrófilos también han sido observados en los ratones IL-17RA KO en un modelo de psoriasis inducida por imiquimod (El Malki 2013), sugiriendo que mecanismos pro-inflamatorios, independientes de la presencia de microorganismos, podrían estar regulados de forma positiva en la ausencia de la señalización por IL-17. En el modelo de dermatofitosis epicutánea en ratones IL-17RAKO, cuando la carga fúngica de la piel es baja y similar a la de los WT (día 4 p.i) (**Figura 17b**), no se detecta la producción de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos de células epidérmicas. Estos datos sugieren que la respuesta inflamatoria exacerbada en los ratones IL-17RA estaría gatillada por la elevada cantidad de hongo en la piel en el día 8 p.i, momento en el que se observa el desbalance de citoquinas en las células epidérmicas (**Figura 18f**).

Por otra parte, el análisis de la respuesta inmune adaptativa en los ratones IL-17RA KO infectados con *M. canis* demostró el predominio de una respuesta de tipo Th1, caracterizada por la producción de IFN- γ antígeno-específica por las células mononucleares de ganglios linfáticos drenantes de piel (**Figura 19**). La falta de IL-17 promovió además una fuerte inflamación en los ganglios, evidenciada por el marcado aumento del número de células en los ratones IL-17RA KO, respecto a los WT, luego de

la infección (**Figura 19a**). En este sentido, se ha reportado que IL-17A inhibe directamente la producción de IFN- γ por supresión del factor de transcripción T-bet en linfocitos T, el cual es el regulador principal de la respuesta Th1. Consecuentemente, los ratones deficientes en IL-17 desarrollan una enfermedad inflamatoria agresiva mediada por IFN- γ en la colitis autoinmune experimental (O'Connor 2009) o rechazo del injerto contra el huésped, en un modelo de trasplante de piel (Vokaer 2013). Otro mecanismo regulatorio de IFN- γ mediado por IL-17 se demostró en un modelo murino de enfermedad de Chagas en ratones IL-17RA KO, en el cual el aumento en la producción de IFN- γ por los linfocitos T, en ausencia de IL-17, era consecuencia de un menor reclutamiento de neutrófilos productores de IL-10 (Tosello Boari 2012). En el modelo de infección con *M. canis* de esta tesis, es poco probable que la inducción de la respuesta Th1 se deba a la falta de reclutamiento de neutrófilos productores de IL-10 en los ratones IL-17RA KO, ya que por el contrario (como se discutió previamente) estos ratones presentan un marcado aumento de neutrófilos infiltrantes de la piel luego de la infección (**Figura 16 y Figura 18a**).

De acuerdo con los resultados presentados, se demostró que la intensa inflamación cutánea observada en los ratones IL-17RA KO infectados con *M. canis* depende parcialmente de la respuesta Th1, ya que el tratamiento con un anticuerpo monoclonal neutralizante de IFN- γ (luego del establecimiento de la infección), disminuyó significativamente la producción de TNF y el influjo de neutrófilos a la piel en los ratones IL-17RA KO (**Figura 20a, b, c y d**). Sorprendentemente, el tratamiento con anti-IFN- γ también disminuyó la carga fúngica en la piel en los ratones deficientes en la vía de IL-17 (**Figura 20c y d**). Este fenómeno podría deberse a que, en ausencia de IFN- γ y de señalización de IL-17, en la piel se inducen citoquinas compensatorias que activan mecanismos protectores. De acuerdo con esto, los ratones deficientes de IL-17RA y tratados con anti-IFN- γ , efectivamente muestran un incremento significativo en la producción de citoquinas involucradas en la respuesta de IL-17 y una disminución de la citoquina supresora IL-10 por las células epidérmicas (**Figura 20d**). Si bien IL-17 no puede señalizar en ausencia de su receptor, es posible que un ambiente cutáneo con elevada producción de IL-23 y otras citoquinas del mismo perfil como IL-22, IL-1 β e IL-6 (**Figura 20d**), junto con bajos niveles de IL-10, contribuyan a inhibir la proliferación fúngica en la piel. Estos datos abren una nueva perspectiva para profundizar el estudio de los procesos que regulan la inmunidad cutánea en ausencia de IL-17 e IFN- γ . Por lo tanto, los resultados de esta tesis demuestran que, en la dermatofitosis experimental con *M.*

canis, la inmunidad por IL-17 inhibe la invasión fúngica superficial y suprime la respuesta inflamatoria Th1, la cual es poco eficiente para controlar la infección en la piel. Apoyando estos resultados, experimentos preliminares en nuestro laboratorio muestran que ratones deficientes en el receptor de TNF (TNFR KO) no muestran diferencias en la susceptibilidad frente a la infección respecto a los ratones WT (datos no mostrados). Además, coincidentemente con los datos presentados, un estudio publicado muestra que ratones deficientes en IFN- γ (IFN- γ KO) no tienen diferencias en la carga fúngica con respecto a la cepa WT (C57BL/6), luego de la infección en la piel con el dermatofito *T. rubrum* (de Matos Baltazar 2014).

Por otra parte, en esta tesis se demostró que los efectos biológicos observados durante la infección con *M. canis* en los ratones deficientes de IL-17RA se reprodujeron en los ratones doble knock-out para IL-17A e IL-17F (Haas 2012) (**Figura 21**). Estos datos indican que los fenómenos observados en nuestro modelo dependerían, principalmente, de IL-17A ya que no se detectó producción de IL-17F por los linfocitos T durante la infección. De acuerdo con estas evidencias, en un modelo de infección cutánea con *Candida albicans* se demuestra que la respuesta protectora depende de IL-17A y no de otras citoquinas de la familia IL-17 que señalizan por IL-17RA (IL-17C, IL-17F e IL-17E) (Ramírez-Carrozzi 2011, Conti 2015).

Considerando todos los resultados obtenidos de la dermatofitosis en ratones WT y deficientes en la señalización mediada por IL-17, en este estudio se ha demostrado una *función dual* de las citoquinas IL-17 durante la infección en la piel por *M. canis*. Por un lado, la respuesta de IL-17 controla la proliferación de *M. canis* en la epidermis y, por otro lado, regula la inflamación exacerbada mediada por Th1. Eventualmente, los ratones con ausencia de señalización por IL-17RA, fueron capaces de controlar la dermatofitosis, pero a expensas de una mayor inflamación y daño tisular. Es probable que los mecanismos protectores de la respuesta inmune mediada por IL-17 en la dermatofitosis dependan del mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial y/o de la producción de péptidos antimicrobianos por la epidermis. Además, es claro que, en ausencia de IL-17 e IFN- γ , se disparan mecanismos de defensa cutáneos compensatorios que logran eliminar al dermatofito de la piel y evitar la diseminación fúngica extra-cutánea.

Luego de haber estandarizado el modelo de infección superficial y de definir la función de la inmunidad mediada por IL-17 en la protección frente a *M. canis*, se investigó la participación *in vivo* de las células de Langerhans en la inmunidad anti-dermatofítica.

Para confirmar los resultados obtenidos *in vitro*, se reprodujo la infección epicutánea con *M. canis* en ratones Lang-EGFPDTR. Estos ratones permiten la depleción inducible de las células que expresan langerina usando la toxina diftérica (DT) (Kissenpfennig 2005, Bobr 2010). Los ratones depletados de células que expresan langerina (LC y una población minoritaria de células dendríticas de la dermis) (Bennet 2007, Kashem 2017), e infectados con *M. canis* (**Esquema 4** y **Figura 22**), mostraron una disminución significativa en la frecuencia y número absoluto de los linfocitos T CD4⁺ productores de IL-17A de ganglios linfáticos drenantes de piel y una tendencia similar en los niveles de IL-17A/F en el sobrenadante de cultivo, luego de la re-estimulación con antígenos del hongo, con respecto a los ratones competentes en LC (**Figura 23**). Consecuentemente y coincidiendo con los resultados que demuestran la participación de la señalización de IL-17 en la supresión de la respuesta Th1 luego de la infección (**Figura 19** y **Figura 21**), los ratones depletados de LC muestran una tendencia de niveles aumentados de IFN- γ en sobrenadantes de linfocitos T de ganglios drenantes de piel re-estimulados con HKMc (**Figura 23d**). Estos resultados confirman los experimentos *in vitro* mostrados en el Capítulo 4, Sección 4.1.1 (**Figura 8**) y demuestran la participación *in vivo* de las LC en la inducción de la respuesta Th17 anti-dermatofítica.

Sin embargo, aunque la ausencia de LC se relacionó con una disminución de células T productoras de IL-17 y, a diferencia de lo observado en los animales deficientes de IL-17 (**Figura 16** y **Figura 21**), los animales depletados de LC no fueron más susceptibles a la invasión fúngica superficial y no presentaron una respuesta inflamatoria exacerbada en la piel, comparados con los ratones WT (**Figura 24**). Estos resultados son similares a los publicados por Igyártó *et al.* (Igyártó 2011) que observaron la participación de las LC en la diferenciación a Th17 durante la candidiasis cutánea experimental, pero su depleción no promovió un aumento de la colonización fúngica. Este fenómeno podría estar mediado por células de la inmunidad innata residentes del tejido, tales como linfocitos T $\gamma\delta$ o ILC, ya que se ha demostrado que protegen contra infecciones de la piel o de las mucosas por *Staphylococcus aureus* o *Candida albicans* mediante la producción de IL-17A (Conti 2009, Kobayashi 2015), independientemente de las LC o del establecimiento de la inmunidad adaptativa. En este sentido, en nuestro laboratorio se están llevando a cabo experimentos para caracterizar las poblaciones celulares productoras de IL-17 en la piel durante la infección con *M. canis*. Resultados preliminares muestran que al día 8 p.i., en la epidermis, se detectan dos poblaciones productoras de IL-17: linfocitos T $\gamma\delta$ y linfocitos T convencionales (TCR β) (datos no mostrados). Por lo tanto, si bien las LC inducen una

respuesta adaptativa Th17 específica para *M. canis*, otras poblaciones de células inmunes de la piel pueden producir esta citoquina y, por lo tanto, podrían ser capaces de controlar de la infección.

Las evidencias de este modelo de dermatofitosis sugieren que, en la protección frente a la infección primaria con *Microsporum canis*, serían más relevantes los mecanismos de la respuesta tipo 17 involucrados en la inmunidad innata que la respuesta inmune adaptativa. Experimentos focalizados en estudiar la evolución de la infección en ratones *Rag1*^{-/-} (los cuales no poseen linfocitos B y T maduros) podrían confirmar esta hipótesis. En este sentido, es probable que la respuesta adaptativa Th17 sea necesaria para el control rápido y eficiente frente a una infección secundaria (re-infección) con un dermatofito, tal como se ha observado en candidiasis cutánea (Hernández-Santos 2013). Para confirmar esta hipótesis, se pueden realizar experimentos de reinfección con *M. canis* en ratones IL-17RAKO que han resuelto la infección primaria o en ratones WT tratados con un anticuerpo neutralizante de IL-17.

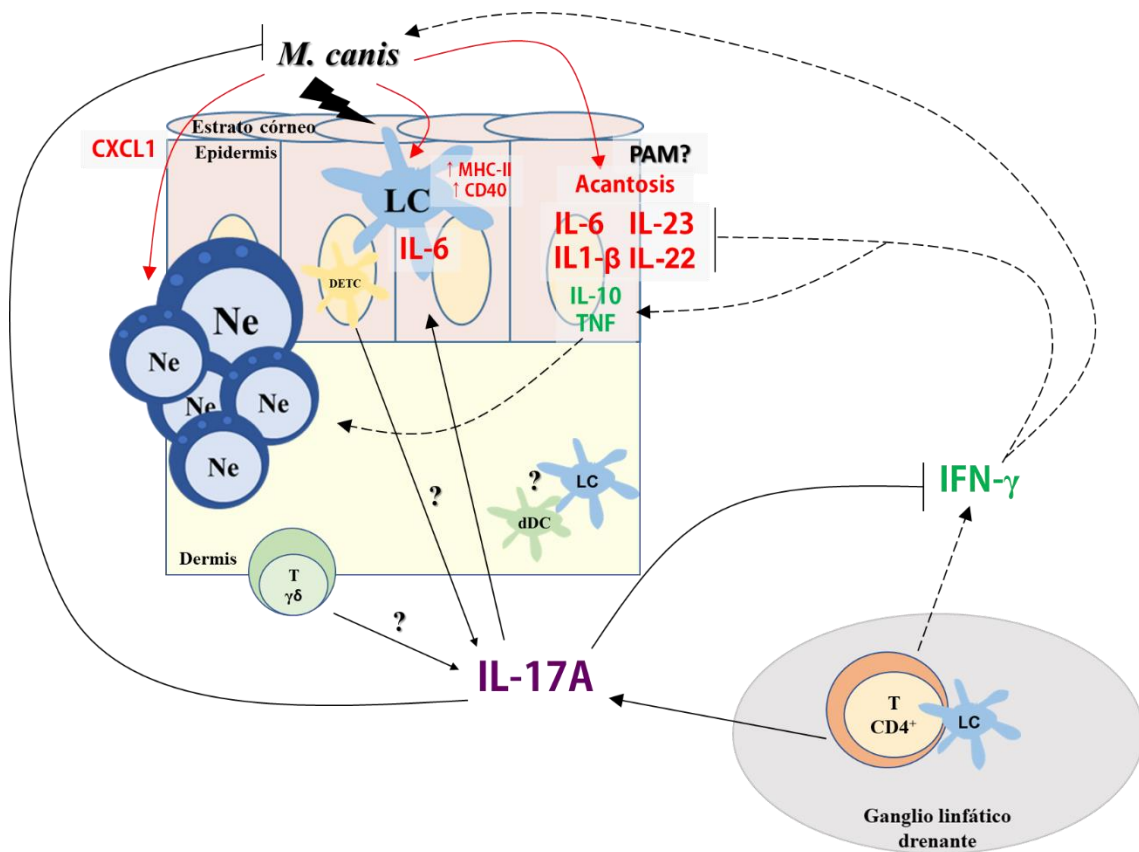
Por otra parte, la depleción de LC en los ratones Lang-EGFPDTR no elimina completamente a las células T productoras de IL-17A en los ganglios y, de hecho, se detecta producción de IL-17 en sobrenadantes de cultivo de células de los ganglios drenantes de piel y re-estimuladas con HKMc (**Figura 23c**) Es posible que, durante la infección, otras células presentadoras de antígenos también contribuyan a la diferenciación a Th17. Esto se ha demostrado en estados inflamatorios de la piel, donde monocitos Gr1⁺ de la sangre (Ginhoux 2006, Seré 2012) o provenientes de los folículos pilosos (Nagao 2012) pueden diferenciarse a LC y repoblar la epidermis. Además, en un contexto infeccioso, células dendríticas dérmicas CD11b⁺ pueden reconocer a pseudohifas de *C. albicans* e inducir una respuesta Th17 en ganglios linfáticos (Igyártó 2011, Kashem 2015). Inclusive se ha reportado la migración de neutrófilos con patógenos a los ganglios linfáticos drenantes de piel, lo cual permitiría la fagocitosis y presentación antigénica por las DC residentes de los ganglios linfáticos (Mantovani 2011).

En esta tesis se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* que, en la dermatofitosis experimental, las LC participan en la inducción de la inmunidad adaptativa tipo Th17 de forma similar a otros modelos experimentales donde los antígenos se encuentran confinados a la epidermis (Kaplan 2017). Evidentemente, la piel es un tejido con muchos mecanismos compensatorios y redundantes que le permiten mantener eficientemente su función de barrera inmunológica con el medio exterior. En este sentido, son necesarias más investigaciones para profundizar los mecanismos protectores mediados por citoquinas IL-

17 en la piel y los fenómenos antifúngicos compensatorios, en ausencia de la señalización de estas citoquinas. La activación de mecanismos innatos mediados por la molécula adaptadora CARD-9 (Leibundgut-Landmann 2007), la producción de péptidos antimicrobianos en la epidermis y/o la acción directa de citoquinas relacionadas con la respuesta tipo 17 tales como IL-22, IL-23, IL-6 e IL-1 β , serían vías posibles de inmunidad anti-dermatofítica en la piel. Recientemente, varios estudios clínicos han demostrado que pacientes con formas raras de infecciones crónicas profundas por dermatofitos están asociadas a mutaciones en el gen *CARD9* (Rouzaud 2016). La molécula CARD9, junto con Bcl10 y MALT1, está involucrada en la señalización de varios receptores tipo Lectina C (CLR) (Grumach 2015, Drummond 2016). Aunque en algunos pacientes estudiados se encontraron varios defectos funcionales, tales como menor producción de IL-6 por células de sangre entera estimuladas con antígenos fúngicos (Lanternier 2013), menor proporción de linfocitos Th17 evaluados *ex vivo* (Lanternier 2013) y defectos en los neutrófilos (Grumach 2015a), no se conocen cuáles son los mecanismos dependientes de CARD9 que generarían la inmunidad antifúngica.

Capítulo 6: Conclusiones

En esta tesis de doctorado se ha establecido un modelo de infección superficial por *M. canis* el cual revela que en la dermatofitosis predomina una respuesta adaptativa específica tipo Th17. Además, se ha demostrado, por primera vez, que la vía de señalización de IL-17 es fundamental en el control de la infección superficial y en la restricción de la inflamación exacerbada luego de la invasión de la piel por un dermatofito. En ausencia de señalización vía IL-17 e IFN- γ , se activarían mecanismos protectores eficientes que inhiben la proliferación de *M. canis* en la piel. Además, se demostró que las células de Langerhans son importantes en la promoción de la respuesta Th17 específica, pero no contribuyen significativamente en la protección frente a la infección primaria con *M. canis*.



Modelo propuesto. *Microsporum canis* infecta el estrato córneo de la piel y genera la producción de las citoquinas IL-6, IL-23, IL-22 e IL-1 β por las células epidérmicas, genera un aumento en la proliferación celular (acantosis) e induce el reclutamiento de neutrófilos (Ne) mediado por CXCL1. A su vez, el hongo es reconocido por las células de Langerhans (LC) de la epidermis que aumentan la expresión de MHC-II y CD40, producen IL-6 y migran hacia ganglios linfáticos drenantes de piel para presentar los antígenos fúngicos a las células T CD4⁺ vírgenes. Estos linfocitos T van a producir IL-17A (linfocitos Th17) que permite controlar un crecimiento

exacerbado del hongo posiblemente mediante la actividad de péptidos antimicrobianos (PAM). IL-17A también restringe una inflamación cutánea exacerbada mediada por IFN- γ caracterizada por un mayor reclutamiento de Ne, la producción de TNF e IL-10 durante la infección y, sorprendentemente, un aumento en la proliferación fúngica. Además, IFN- γ inhibe la producción de citoquinas de la respuesta tipo 17 por la epidermis, como IL-6, IL-22, IL-23 e IL-1 β , que están involucradas en la protección eficiente frente a *M. canis*. Todavía no se ha estudiado el rol de otras poblaciones de células dendríticas cutáneas que podrían estar involucradas en la inducción de la respuesta descrita u otras células productoras de IL-17 como las células T $\gamma\delta$ y las DETC que participen en la respuesta tipo IL-17 reportada.

Capítulo 7: Perspectivas

Esta tesis ha sido el primer trabajo de una nueva línea de investigación que abre diferentes perspectivas de investigación para comprender la inmunidad de la piel en el contexto de la infección dermatofítica. Las perspectivas se centran en varios objetivos:

- 1) Definir los mecanismos antifúngicos dependientes de IL-17, estudiando la producción de péptidos antimicrobianos y otras funciones de barrera de la piel.
- 2) Determinar los mecanismos de reconocimiento fúngico, inmunidad innata e inducción de IL-17 en la piel.
- 3) Estudiar la función de los neutrófilos durante la dermatofitosis.
- 4) Investigar el impacto de la respuesta Th17 en una infección secundaria y/o en una respuesta de memoria.
- 5) Entender los mecanismos regulatorios cutáneos dependientes de IFN- γ y su relación con la señalización de IL-17.

Capítulo 8: Bibliografía

Achterman R. R., White T. C. (2012) A foot in the door for dermatophyte research. *PLoS Pathogens*, 8(3):e1002564.

Achterman R. R., White T. C. (2013) Quick guide: Dermatophytes. *Current Biology*, 23(13):R551-552.

Achterman R.R, Moyes D. L., Thavaraj S., Smith A. R., Blair K. M., White T. C., Naglik J. R. (2015) Dermatophytes activate skin keratinocytes via Mitogen-Activated Protein Kinase signaling and induce immune responses. *Infection and Immunity*, 83:1705-1714.

Ahmed S. M., Rather S. R., Kousar H., Bukhari S. (2016) Tinea capitis in adults: not so rare. *International Journal of Research in Medical Sciences*, 4(12):5426-5429.

Almeida S. R. Immunology of Dermatophytosis. (2008) *Mycopathologia*, 166:277-283.

Alves de Medeiros A. K., Lodewick E., Bogaert D. J. A., Haerynck F., Van daele S., Lambrecht B., Bosma S., Vanderdomckt L., Lortholary O., Migaud M., Casanova J-L., Puel A., Lanternier F., Lambert J., Brochez L., Dulalers M. (2016) Chronic and invasive fungal infections in a family with CARD9 deficiency. *Journal of Clinical Immunology*, 36:204-209.

Amatya N., Garg A. V., Gaffen S. L. (2017) IL-17 signaling: The yin and the yang. *Trends in Immunology* 38(5):310-322.

Arenas R., Toussaint S., Isa-Isa R. (2006) Kerion and dermatophytic granuloma. Mycological and histopathological findings in 19 children with inflammatory tinea capitis of the scalp. *International Journal of Dermatology*, 45:215-219.

Artis D., Spits H. (2015) The biology of innate lymphoid cells. *Nature*, 517:293-301.

Baldo A., Mathy A., Tabart J., Camponova P., Vermout S., Massart L. Maréchal F., Galleni M., Mignon B (2009). Secreted subtilisin Sub3 from *Microsporum canis* is required for adherence to but not for invasion of the epidermis. *British Journal of Dermatology*, 162:990-997.

Baldo A., Monod M., Mathy A., Cambier L., Bagut E. T., Defaweux V., Symoens F., Antoine N., Mignon B. (2011) Mechanisms of skin adherence and invasion by dermatophytes. *Mycoses*, 55(3):218-223.

- Belkaid Y., Tamoutounour S. (2016) The influence of skin microorganisms on cutaneous immunity. *Nature Reviews Immunology*, 16:353-366.
- Bennet C. L., Clausen B. E. (2007) DC ablation in mice: promises, pitfalls and challenges. *Trends in Immunology*, 28(12):525-531.
- Blake J. S., Dahl M. V., Herron M. J., Nelson R. D. (1991) An immunoinhibitory cell wall glycoprotein (mannan) from *Trichophyton rubrum*. *Journal of Investigative Dermatology*, 96:657-661.
- Bobr A., Olvera-Gomez I., Igyártó B. Z., Haley K. M., Hogquist K. A., Kaplan D. H. (2010) Acute ablation of Langerhans cells enhances skin immune responses. *The Journal of Immunology*, 185:4724-4728.
- Bonifaz Trujillo, J. A. Micología Médica Básica (2015). 5ta. Edición. McGraw-Hill Interamericana Editores.
- Braathen L. R., Kaaman T. (1983) Human epidermal Langerhans cells induce cellular immune response to trichophytin in dermatophytosis. *British Journal of Dermatology*, 109:205-300.
- Brasch J. (2009) Current knowledge of host response in human tinea. *Mycoses*, 52:304-312.
- Brasch J. (2010) Pathogenesis of tinea. *Journal of the German Society of Dermatology*, 8(10):780-786.
- Brasch J., Hipler U. (2008) Clinical aspects of dermatophyte infections. Pp 263-286. Human and animal relationships. 2nd edition. The Mycota VI.A. A. Brackhage and P.F. Zipfel. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Brasch J., Martens H., Sterry W. (1993) *Clinical and Experimental Dermatology*, 18:329-332.
- Brasch J., Morig A., Neumann B., Proksch E. (2014) Expression of antimicrobial peptides and toll-like receptors is increased in tinea and pityriasis versicolor. *Mycoses*, 57:147-152.

Bressani V. O., Santi T. N., Domingues-Ferreira M., Almeida A., Duarte A. J. S., Moraes-Vasconcelos D. (2013) Characterization of the cellular immunity in patients presenting extensive dermatophytoses due to *Trichophyton rubrum*. *Mycoses*, 56:281-288.

Brown G. D., Netea M. G. (2012) Exciting developments in the immunology of fungal infections. *Cell Host and Microbe*, 11:422-424.

Calderon R.A., Hay R. J. (1984) Cell-mediated immunity in experimental murine dermatophytosis. II. Adoptive transfer of immunity to dermatophyte infection by lymphoid cells from donors with acute or chronic infections. *Immunology*, 53:465-472.

Calderon R.A., Hay R. J. (1987a) Fungicidal activity of human neutrophils and monocytes on dermatophyte fungi, *Trichophyton quinckeanum* and *Trichophyton rubrum*. *Immunology*, 61:289-295.

Calderon R.A., Shennan G. I. (1987) Susceptibility of *Trichophyton quinckeanum* and *Trichophyton rubrum* to products of oxidative metabolism. *Immunology*, 61:283-288.

Cambier L., Heinen M. P., Mignon B. (2017) Relevant animal models in dermatophyte research. *Mycopathologia*, 182:229-240.

Cambier L., Mathy A., Baldo A., Bagut E. T., Tabart J., Antoine N., Mignon B. (2013) Feline polymorphonuclear neutrophils produce pro-inflammatory cytokines following exposure to *Microsporum canis*. *Veterinary Microbiology*, 162:800-805.

Cambier L., Weatherspoon A., Defaweux V., Bagut E. T., Heinen M. P., Antoine N., Mignon B. (2014) Assessment of the cutaneous immune response during *Arthroderma benhamiae* and *A. vanbreuseghemii* infection using an experimental mouse model. *British of Journal Dermatology*, 170:625-633.

Carballo G. M., Cavallin, I. C., Colotti, M., Corso S., López, A. (2011) Abordaje epidemiológico de la consulta dermatológica por micosis superficiales en 4 centros sanitarios de Córdoba. *XII Congreso Argentino de Micología. XXII Jornadas Argentinas de Micología*.

Chen K., Eddens T., Trevejo-Nunez G., Way E. E., Elsegeiny W., Ricks D. M., Garg A. V, Erb C. J., Bo M., Wang T., Chen W., Lee J. S., Gaffen S. L., Kolls J. K. (2016) IL-17

Receptor Signaling in the Lung Epithelium Is Required for Mucosal Chemokine Gradients and Pulmonary Host Defense against *K. pneumoniae*. *Cell Host & Microbe*, 20:1-10.

Chiapello L. S., Dib M. D., Nuncira C. T., Nardelli L., Vullo C., Collino C., Abiega C., Cortes P. R., Spesso M. F., Masih D. T. (2011) Mycetoma of the scalp due to *Microsporum canis*: hystopathologic, mycologic, and immunogenetic features in a 6-year-old girl. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 70:145-149.

Cho J. S., Pietras E. M., Garcia N. C., Ramos R. I., Farzam D. M., Monroe H. R., Magorien J. E., Blauvelt A., Kolls J. K., Cheung A. L., Cheng G., Modlin R. L., Mille L.S. (2010) IL-17 is essential for host defense against cutaneous *Staphylococcus aureus* infection in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(5):1762-1773.

Chung J-S., Yudate T., Tomihari M., Akiyoshi H., Cruz P. D., Ariizumi K. (2009). Binding of DC-HIL to dermatophytic fungi induces tyrosine phosphorylation and potentiates antigen presenting cell function. *The Journal of Immunology*, 183:5190-5198.

Clausen B. E., Stoitzner P. (2015) Functional specialization of skin dendritic cells subsets in regulating T cell responses. *Frontiers in Immunology*, 6:534.

Combadiere B., Liard C. (2011) Transcutaneous and intradermal vaccination. *Human Vaccines*, 7(8):811-827.

Conti H. R., Peterson A. C., Brane L., Huppler A. R., Hernández-Santos N., Whibley N., Garg A. V., Simpson-Abelson M. R., Gibson G. A., Mamo A. J., Osborne L. C., Bishu S., Ghilardi N., Siebenlist U., Watkins S. C., Artis D. McGeachy M. J., Gaffen S. L. (2014) Oral-resident natural Th17 cells and $\gamma\delta$ T cells control opportunistic *Candida albicans* infections. *Journal of Experimental Medicine*, 211:2075-2084.

Conti H. R., Shen F., Nayyar N., Stocum E., Sun J. N., Lindemann M. J., Ho A. W., Hai J. H., Yu J. J., Jung J. W., Filler S. G., Masso-Welch P., Edgerton M. Gaffen S. L. (2009) Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *Journal of Experimental Medicine*, 206(2):299-311.

- Cua D. J., Tato C. M. (2010) Innate IL-17 producing cells: the sentinels of the immune system. *Nature Reviews Immunology*, 10:479-489.
- Dahl M. V. (1993) Suppression of immunity and inflammation by products produced by dermatophytes. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 28:S19-S23.
- de Jong M. A. W. P., Geijtenbeek T. B. H. (2010) Langerhans cells in innate defense against pathogens. *Trends in Immunology*, 31(12):452-459.
- de Matos Baltazar L., Campi Santos P., Prosperi de Paula T., Rachid M A., Cisalpino P.S., Souza D. G., Santos D. A. (2014) IFN- γ impairs *Trichophyton rubrum* proliferation in a murine model of dermatophytosis through the production of IL-1 β and reactive oxygen species. *Medical Mycology*, 52:293-302.
- Di Meglio P., Perera G. K., Nestle F. O. (2011) The multitasking organ: recent insights into the skin immune function. *Immunity*, 35:857-869.
- Doebel T., Voisin B., Nagao K. (2017) Langerhans cells – the macrophage in dendritic cell clothing. *Trends in Immunology*, 38(11):817-828.
- Drummond R. A., Lionakis M. S. (2016) Mechanistic insights into the role of C type lectin receptor / CARD9 signaling in human antifungal immunity. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 6:39.
- Duek L., Kaufman G., Ulman Y., Berdicevski I. (2004) The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. *Journal of Infection*, 48:175-180.
- El Malki K., Karbach S. H., Huppert J., Zayoud M., Reißig S., Schüler R., Nikolaev A., Karram K., Münzel T., Kuhlmann C. R. W., Luhmann H. J., von Stebut E., Wörtge S., Kurschus F. C., Waisman A. (2013) An Alternative Pathway of Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in the absence of interleukin-17 receptor A signaling. *Journal of Investigative Dermatology*, 133:441-451.
- Erwig L. P., Gow N. A. R. (2016) Interactions of fungal pathogens with phagocytes. *Nature Reviews Microbiology*, 14:163-176.
- Espinosa E., Rivera A. (2012) Cytokines and the regulation of fungus-specific CD4 T cell differentiation. *Cytokine*, 58:100-106.

Fritz P. Beck-Jendroschek V., Brasch J. (2012) Inhibition of dermatophytes by the antimicrobial peptides human β -defensin-2, ribonuclease 7 and psoriasin. *Medical Mycology*, 50:579-584.

Fujita Y., Koinuma S., De Velasco M. A., Bolz J., Togashi Y., Terashima M., Hayashi H., Matsuo T., Nishio K. (2014) Melanoma transition is frequently accompanied by a loss of cytoglobin expression in melanocytes: a novel expression site of cytoglobin. *PLOS One*, 4:e94772.

Gaffen S. L. (2009) Structure and signalling in the IL-17 receptor family. *Nature Reviews Immunology*, 9:556-567.

Gaiser M. R., Lämmermann T., Feng X., Igyartó B. Z., Kaplan D. H., Tessarollo L., Germain R. N., Udey M. C. (2012) Cancer-associated epithelial cell adhesion molecule (EpCAM; CD326) enables epidermal Langerhans cell motility and migration *in vivo*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(15):E889-E897.

Gallo R. L., Hooper L. V. (2012) Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nature Reviews Immunology*, 12:503-516.

Ginhoux F., Tacke F., Angeli V., Bogunovic M., Loubeau M., Dai X-M., Stanley E. R., Randolph G. J., Merad M. (2006) Langerhans cells arise from monocytes *in vivo*. *Nature Immunology*, 7(3):265-273.

Gladiator A., Trautwein-Weidner K., Bär E., LeibundGut-Landmann S. (2013) Arming Th17 cells for antifungal host defense. *Current Fungal Infection Reports*, 7:138-143.

Gräser Y., Scott J., Summerbell R. (2008) The new species concept in dermatophytes – a polyphasic approach. *Mycopathologia*, 166:239-256.

Grumach A. (2015) A new CARD9 mutation (R101S) in a Brazilian patient with DEEP dermatophytosis. *World Allergy Organization Journal*, 8 (Suppl 1):A77.

Grumach A. S., de Queiroz-Telles F., Migaud m., Lanternier F., Rosario Filho N., Palma S. M. U., Constantino-Silva R. N., Casanova J. L., Puel A. (2015a) A homozygous

CARD9 mutation in a Brazilian patient with deep dermatophytosis. *Journal of Clinical Immunology*, 35:486-490.

Grumbt M., Monod M., Staib P. (2011) Genetic advances in dermatophytes. *FEMS Microbiology Letters*, 320:79-86.

Grumbt M., Monod M., Yamada T., Hertweck C., Kunert J., Staib P. (2013) Keratin degradation by dermatophytes relies on cysteine dioxygenase and a sulfite efflux pump. *Journal of Investigative Dermatology* 133(6):1550-1555.

Grunwald M. H., Amichai B., Shemer A. (2014) Fingertip contamination after a brief touch of *tinea capitis* lesions caused by *Microsporum canis*. *British Journal of Dermatology*, 172(1):291-292.

Gupta A. K., Taborda P., Taborda V., Gilmour J., Rachlis A., Salit I., Gupta M. A., MacDonald P., Cooper E. A., Summerbell R. C. (2000) Epidemiology and prevalence of onychomycosis in HIV-positive individuals. *International Journal of Dermatology*, 39:746-753.

Haas J. D., Ravens S., Düber S., Sandrock I., Oberdörfer L., Kashani E., Chennupati V., Föhse L., Naumann R., Weiss S., Krueger A., Förster R., Prinz I. (2012) Development of interleukin-17-producing $\gamma\delta$ T cells is restricted to a functional embryonic wave. *Immunity*, 37:48-59.

Hashimoto T. (1991) Chapter 8: *Infectious Propagules of Dermatophytes*. Pag 181- 202. The fungal spore and disease initiation in plants and animals. Edited by Cole G. T., Hoch H. C.

Havlickova B. Czaika V. A., Friedrich M. (2008) Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses*, 51(Suppl 4):2-15.

Hay R. J. (2006) How do dermatophytes survive in the epidermis? *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19:125-126.

Hay R. J. (2007) Chapter 10: Immune responses to dermatophytosis. En: Kavanagh K. (ed.), *New Insights in Medical Mycology*. Springer 2007.

Hay R. J. (2016) Chapter 8: Fungal infections of the skin. p. 157-186. En: Ólafsson J. H., Hay R. J. (eds.), *Antibiotic and Antifungal Therapies in Dermatology*. Springer International Publishing, 2016.

Hay R. J. (2016a) Chapter 9: Fungal infections of the hair. p. 187-202. En: Ólafsson J. H., Hay R. J. (eds.), *Antibiotic and Antifungal Therapies in Dermatology*. Springer International Publishing, 2016.

Hay R. J. (2017) Tinea capitis: current status. *Mycopathologia* 182:87-93.

Hay R. J., Calderon R. A., Collins M. J. (1983) Experimental dermatophytosis: the clinical and histopathologic features of a mouse model using *Trichophyton quinckeanum* (mouse favus). *Journal of Investigative Dermatology*, 81:270-274.

Hayette M., Sacheli R. (2015) Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. *Current Fungal Infection Reports*, 9:164-179.

Heath W. R., Carbone F. R. (2013) The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. *Nature Immunology*, 14(10):978-985.

Heddergott C., Bruns S., Nietzsche S., Leonhardt I., Kurzai O., Kniemeyer O. Brakhage A.A. (2012) The *Arthroderma benhamiae* hydrophobin HypA mediates hydrophobicity and influences recognition by human immune effector cells. *Eukaryotic cell*, 11(5):673-682.

Heinen M-P, Cambier L., Fievez L., Mignon B. (2017) Are Th17 cells playing a role in immunity to dermatophytosis? *Mycopathologia*, 182:251-261.

Hernández-Santos N., Huppler A. R., Peterson A. C., Khader S. A., McKenna K. C., Gaffen S. L. (2013). Th17 cell confer long term adaptive immunity to oral mucosal *Candida albicans* infections. *Mucosal Immunology*, 6(5):900-910.

Heufler C., Koch F., Schuler G. (1988) Granulocyte/Macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine*, 167:700-705.

- Hirota K, Ahlfors H., Duarte J. H., Stockinger B. (2012) Regulation and function of innate and adaptive interleukin-17 producing cells. *EMBO reports* 13:113-120.
- Hohl T. M., Rivera A., Pamer E. G. (2006) Immunity to fungi. *Current Opinion in Immunology*, 18:465-472.
- Hu W., Troutman T. D., Edukulla R., Pasare C. (2011) Priming microenvironments dictate cytokine requirements for T helper 17 cell lineage commitment. *Immunity*, 35:1010-1022.
- Hube B., Hay R., Brasch J., Veraldi S., Schaller M. (2015) Dermatomycoses and inflammation: the adaptive balance between growth, damage, and survival. *Journal de Mycologie Medical*, 25(1):e44-e58.
- Igyártó B.Z, Haley K., Ortner D., Bobr A., Gerami-Nejad M., Edelson B. T., Zurawski S. M., Malissen B., Zurawski G., Berman J., Kaplan D. H. (2011) Skin-resident murine dendritic cells subsets promote distinct and opposing antigen-specific T helper cell responses. *Immunity*, 35:260-272.
- Iwakura Y., Ishigame H., Saijo S., Nakae S. (2011) Functional specialization of Interleukin-17 family members. *Immunity*, 34:149-162.
- Jensen J., Pfeiffer S., Akaki T., Schröder J., Kleines M., Neumann C., Proksch E., Brasch J. (2007) Barrier function, epidermal differentiation and human β -defensin 2 expression in *tinea corporis*. *Journal of Investigative Dermatology* 127:1720-1727.
- John A. M., Schwartz R. A., Janniger C. K. (2016) The kerion: an angry tinea capitis. *International Journal of Dermatology*, 1-7.
- Johnson R. A. (2000) Dermatophyte infections in human immune deficiency virus (HIV) disease. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 43:S135-142.
- Kabashima K. (Ed.) (2016) *Immunology of the skin*. Basic and clinical sciences in skin immune responses. Springer Japan. 2016.
- Kanbe T., Tanaka K. (1982) Ultrastructure of the invasion of human hair *in vitro* by the keratinophilic fungus *Microsporum gypseum*. *Infection and Immunity*, 38(2):706-715.

Kaplan D. H. (2017) Ontogeny and function of murine epidermal Langerhans cells. *Nature Immunology*, 18(10): 1068-1075.

Kaplan D. H., Kissenpfennig A., Clausen B. E. (2008) Insights into Langerhans cell function from Langerhans cells ablation models. *European Journal of Immunology*, 38:2369-2376.

Kashem S. W., Haniffa M., Kaplan D. H. (2017) Antigen-presenting cells in the skin. *Annual Reviews in Immunology*, 35:469-499.

Kashem S. W., Igyártó B. Z., Nejad-Gerami M., Kumamoto Y., Mohammed J., Jarrett E., Drummond R. A., Zurawski S. M., Zurawski G., Berman J., Iwasaki A. Brown G. D. Kaplan D. H. (2015) *Candida albicans* morphology and dendritic cell subsets determine T helper cell differentiation. *Immunity*, 42:1-11.

Kashem S. W., Kaplan D. H. (2016) Skin immunity to *Candida albicans*. *Trends in Immunology*, 37(7): 440-450.

Katz-Neu K., Noordegraaf M., Dinges S., Bennett C. L., John D, Clausen B. E, von Stebut E. (2011) Langerhans cells are negative regulators of the anti-*Leishmania* response. *Journal of Experimental Medicine*, 208(5):885-891.

Khosravi A. R., Shokri H., Vahedi G. (2016) Factors in etiology and predisposition of adult *tinea capitis* and review of published literature. *Mycopathologia*, 181:371-378.

Kissenpfennig A., Henri S., Dubois B., Laplace-Builhé C., Perrin P., Romani N., Tripp C. H., Douillard P., Leserman L., Kaiserlian D., Saeland S., Davoust J., Malissen B. (2005) Dynamics and function of Langerhans cells *in vivo*: dermal dendritic cells colonize lymph node areas distinct from slower migrating Langerhans cells. *Immunity*, 22:643-654.

Kobayashi T, Glatz M., Horiuchi K., Kawasaki H., Akiyama H., Kaplan D. H., Kong H. H., Amagai M., Nagao K. (2015) Dysbiosis and *Staphylococcus aureus* colonization drives inflammation in atopic dermatitis. *Immunity*, 42:756-766.

Koga T., Duan H., Urabe K., Furue M. (2001) Immunohistochemical detection of interferon-gamma producing cells in dermatophytosis. *European Journal of Dermatology*, 11(2):105-107.

Koga T., Ishak H., Matsumoto T., Hori Y. (1993) *In vitro* release of interferon-gamma by peripheral blood mononuclear cells of patients with dermatophytosis in response to stimulation with trichophytin. *British Journal of Dermatology*, 128:703-704.

Koga T., Shimizu A., Nakayama J. (2001a) Interferon- γ production in peripheral lymphocytes of patients with *tinea pedis*: comparison of patients with and without *tinea unguium*. *Medical Mycology*, 39:87-90.

Koga, T. (2005) Chapter 22: Immune surveillance against dermatophyte infection. pp. 443-452. En: Fidel P. L., Huffnagle G. B. (Eds.), *Fungal Immunology: From an Organ Perspective*. Springer USA, 2005.

Kubo A., Nagao k., Yokouchi M., Sasaki H., Amagai M. (2009) External antigen uptake by Langerhans cells with reorganization of epidermal tight junction barriers. *Journal of Experimental Medicine*, 26(13): 2937-2946.

Lanternier F., Pathan S., Vincent Q. B., Liu L., Cypowyj S., Prando C., Migaud M., Taibi L., Ammar-Khodja A. Stambouli O. B., Guellil B., Jacobs F., Goffard J-C., Schepers K., del Marmol V, Boussofara L., Denguezli M., Larif M., Bachelez H., Michel L., Lefranc G., Hay R., Jouvion G. Chretien F., Fraitag S., Bougnoux M-E., Boudia M., Abel L., Lortholary O., Casanova J-L., Picard C., Grimbacher B., Puel A. (2013) Deep dermatophytosis and inherited CARD9 deficiency. *New England Journal of Medicine*, 369:1704-1714.

LeibundGut-Landmann S., Groß O., Robinson M. J., Osorio F., Slack E. C., Tsoni S. V., Schweighoffer E., Tybulewicz V., Brown G. D., Ruland J., Reis e Sousa C. (2007) Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nature Immunology*, 8(6):630-638.

LeibundGut-Landmann S., Wüthrich M., Hohl T. M. (2012) Immunity to fungi. *Current Opinion in Immunology*, 24:449-458.

Li H., Wu S., Mao L., Lei G., Zhang L., Lu A., An L., Yang G., Abliz P, Meng G. (2013) Human pathogenic fungus *Trichophyton schoenleinii* activates the NLRP3 inflammasome. *Protein Cell*, 4(4):259–265.

- Lionakis M. S., Ilyev I. D., Hohl T. M. (2017) Immunity against fungi. *JCI Insight*, 2(11):e93156.
- Lourdes 2014. Laura S. Lourdes L. S., Mitchell C. L., Glavin F. L., Schain D. S., Kaye F. J. (2014) Recurrent dermatophytosis (Majocchi granuloma) associated with chemotherapy-induced neutropenia. *Journal of Clinical Oncology*, 32(27):e92-e94.
- Lutz M. B., Döhler A., Azukizawa H. (2010) Revisiting the tolerogenicity of epidermal Langerhans cells. *Immunology and Cell Biology*, 88:381–386.
- Mantovani A., Cassatella M. A., Costantini C., Jaillon S. (2011) Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 11:519-531.
- Mao L., Zhang L., Li H., Chen W., Wang G., Wu S., Guo C., Lu A., Yang G., An L., Abliz P., Meng G. (2014) Pathogenic fungus *Microsporium canis* activates the NLRP3 inflammasome. *Infection and Immunity*, 82(2):882-892.
- Mazza M., Canteros C. E., Davel G. (2011) Epidemiología descriptiva de las dermatofitosis en la provincia de Buenos Aires (2002-2007). XII Congreso Argentino de Micología. XXII Jornadas Argentinas de Micología.
- McGeachy M. J., Chen Y., Tato C. M., Laurence A., Joyce-Shaikh B., Blumenschein W. M., McClanahan T. K., O'Shea J. J., Cua D. j. (2009) The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells *in vivo*. *Nature Immunology*, 10(3):314-324.
- Merad M., Ginhoux F., Collin M. (2008) Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nature Reviews Immunology*, 8:935-947.
- Merad M., Sathe P., Helft J., Miller J., Mortha A. (2013) The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annual Reviews in Immunology*, 31:563-604.

Mignon B. Tabart J., Baldo A., Mathy A., Losson B., Vermout S. (2008) Immunization and dermatophytes. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21:134-140.

Monod M. (2008) Secreted proteases from dermatophytes. *Mycopathologia*, 166:285-294.

Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65:55-63.

Mueller S. N., Zaid A., Carbone F. R. (2014) Tissue-resident T cells: dynamic players in skin immunity. *Frontiers in Immunology*, 5(332):1-6.

Mulholland W. J., Arbuthnott E. A. H., Cellhouse B. J., Cornhill J. F., Austyn J. M., Kendall M. A. F., Cui Z., Tirlapur U. K. (2006) Multiphoton high-resolution 3D imaging of Langerhans cells and keratinocytes in the mouse skin model adopted for epidermal powdered immunization. *Journal of Investigative Dermatology*, 126:1541-1548.

Nagao K., Kobayashi T., Moro K., Ohyama M., Adachi T. Kitashima D. Y., Ueha S., Horiuchi K., Tanizaki H., Kabashima K., Kubo A., Cho Y., Clausen B. E., Matsushima K., Suematsu M., Furtado G. C., Lira S. A., Farber J. M., Udey M. C., Amagai M. (2012) Stress-induced production of chemokines by hair follicles regulates the trafficking of dendritic cells in skin. *Nature Immunology*, 13(8):744-752.

Nakamura Y., Kano R., Hasegawa A., Watanabe S. (2002) Interleukin-8 and Tumor Necrosis Factor alpha production in human epidermal keratinocytes induced by *Trichophyton mentagrophytes*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 9(4):935-937.

Nanjappa S. G., Heninger E., Wüthrich M., Gasper D. J., Klein B. S. (2012) Tc17 cells mediate vaccine immunity against lethal fungal pneumonia in immune deficient hosts lacking CD4⁺ T cells. *PLoS Pathogens*, 8(7):e1002771.

Nenoff P., Krüger C., Ginter-Hanselmayer G., Tietz H. (2014) Mycology – an update. Part 1: Dermatomycoses: causative agents, epidemiology and pathogenesis. *Journal of the German Society of Dermatology*, 12(3):188-210.

- Nestle F. O., Di Meglio P., Qin J-Z., Nickoloff B. J. (2009) Skin immune sentinels in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 9:679-691.
- Nicolas J-F., Guy B. (2008) Intradermal, epidermal and transcutaneous vaccination: from immunology to clinical practice. *Expert Reviews in Vaccines*, 7(8):1201-1214.
- Nielsen J., Kofod-Olsen E., Spaun E., Larsen C. S., Christiansen m., Mogensen T. H. (2015) A STAT1-gain-of-function mutation causing Th17 deficiency with chronic mucocutaneous candidiasis, psoriasiform hyperkeratosis and dermatophytosis. *BMJ Case Reports*, 1-6.
- Nishibu A. Ward B. R., Jester J. V., Ploegh H. L., Boes M., Takashima A. (2006) Behavioral responses of epidermal Langerhans cells *in situ* to local pathological stimuli. *Journal of Investigative Dermatology*, 126:787-796.
- Nnoruka E. N., Chukwuka J. C., Anisuibia B. (2007) Correlation of mucocutaneous manifestations of HIV/AIDS infection with CD4 counts and disease progression. *International Journal of Dermatology*, 46(Suppl. 2):14-18.
- O'Connor W., Kamanaka M. Booth C. J., Town T., Nakae S., Iwakura Y., Koll J. K., Flavell R. A. (2009) A protective function for interleukin 17A in T cell-mediated intestinal inflammation. *Nature Immunology*, 10(6):603-609.
- Ogawa S. (2010) Role of cytokine secretion of human keratinocytes in dermatophytosis. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 51(10):125-130.
- Ortner U., Inaba K., Koch F., Heine M., Miwa M., Schuler G., Romani N. (1996) An improved method for murine migratory cutaneous dendritic cells. *Journal of Immunological Methods*, 193:71-789.
- Pappu R., Rutz S., Ouyang W. (2012) Regulation of epithelial immunity by IL-17 family cytokines. *Trends in Immunology*, 33(7):343-349.
- Pasparakis M., Haase I., Nestle F. O. (2014) Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 14(5):289-301.
- Patel D. D., Kuchroo V. K. (2015) Th17 cell pathway in human immunity: lessons from genetics and therapeutic interventions. *Immunity*, 43:1040-1051.

Pihet M., Le Govic Y. (2017) Reappraisal of conventional diagnosis for dermatophytes. *Mycopathologia*, 182:169-180.

Pujol I., Guarro J., Llop C., Soler L., Fernández-Ballart J. (1996) Comparison study of broth macrodilution and microdilution antifungal susceptibility tests for the filamentous fungi. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 40(9):2106-2110.

Ramirez-Carrozzi V., Sambandam A., Luis E., Lin Z., Jebet S., Lesch J., Hackney J., Kim J., Zhou M., Lai J., Modrusan Z., Sai T., Lee W., Xu M., Caplazi P., Diehl L., de Voss J., Balazs M., Gonzalez Jr. L., Singh H., Ouyang W., Pappu R. (2011) IL-17C regulates the innate immune function of epithelial cells in an autocrine manner. *Nature Immunology*, 12(12):1159-1166.

Rasmussen J. E., Ahmed A. R. (1978) Trichophytin reactions in children with tinea capitis. *Archives in Dermatology*, 114:371-372.

Roediger B., Kyle R., Yip K. H., Sumaria N., Guy T. V., Kim B. S., Mitchell A. J., Tay S. S., Jain R., Forbes-Blom E., Chen X., Tong P. L., Bolton H. A., Artis D., Paul W. E., Fazekas de St. Groth B., Grimbaldston M. A., Le Gros G., Weninger W. (2013) Cutaneous immunosurveillance and regulation of inflammation by group 2 innate lymphoid cells. *Nature Immunology*, 14(6):564-573.

Romani L. Immunity to fungal infections. (2004) *Nature Reviews Immunology*, 4:1-13.

Romani L. Immunity to fungal infections. (2011) *Nature Reviews Immunology*, 11:275-288.

Romani N., Clausen B. E., Stoitzner P. (2010) Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunological Reviews*, 234:120-141.

Rouzaud C. Hay R., Chosidow O., Dupin N., Puel A., Lortholary O., Lanternier F. (2016) Severe dermatophytosis and acquired or innate immunodeficiency: a review. *Journal of Fungi*, 2(4):1-13.

Sakuragi Y., Sawada Y., Hara Y., Ohmori S., Omoto D., Harayuma S., Yoshioka M., Nishio D., Nakamura M. (2016) Increased circulating Th17 cell in a patient with *tinea capitis* caused by *Microsporum canis*. *Allergology International*, 65:215-216.

Sato K., Yang X., Yudate T., Chung J-S., Wu J., Luby-Phelps K., Kimberly R.P., Underhill D., Cruz, P. D., Ariizumi K. (2006) Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor chain to induce innate immune responses. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(50): 38854-38866.

Sawada Y., Nakamura M., Kabashima-Kubo R., Shimauchi T., Kobayashi M., Tokura Y. (2012) Defective epidermal innate immunity and resultant superficial dermatophytosis in adult T-cell leukemia/lymphoma. *Clinical Cancer Research*, 18(14):3722-3779.

Schlitzer A., Ginhoux F. (2014) Organization of the mouse and human DC network. *Current Opinion in Immunology*, 26:90-99.

Séré K., Baek J-H., Ober-Blöbaum J., Müller-Newen G., Tacke F., Yokota Y., Zenke M. Hieronymus T. (2012) Two distinct types of Langerhans cells populate the skin during steady state and inflammation. *Immunity*, 37:905-916.

Shiraki Y., Ishibashi Y., Hiruma M., Nishikawa A., Ikeda S. (2006) Cytokine profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. *Journal of Medical Microbiology*, 55:1175-1185.

Shklovskaya E., O'Sullivan B. J., Ng L. G., Roediger B., Thomas R., Weninger W., Fazekas de St Groth B. (2011) Langerhans cells are precommitted to immune tolerance induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(44):18049-18054.

Smith K. J., Welsh M., Skelton H. (2001) *Trichophyton rubrum* showing deep dermal invasion directly from the epidermis in immunosuppressed patients. *British Journal of Dermatology*, 145:344-348.

Song X., Qian Y. (2013) The activation and regulation of IL-17 receptor mediated signaling. *Cytokine*, 62:175-182.

Song X., Qian Y. (2013a) IL-17 family cytokines mediated signaling in the pathogenesis of inflammatory diseases. *Cellular Signalling*, 25:2335-2347.

Sparber F., LeibundGut-Landmann S. Interleukin 17-mediated host defense against *Candida albicans*. *Pathogens*, 4:606-619.

- Spesso M. F., Nuncira C. T., Burstein V. L., Masih D. T., Dib M. D., Chiapello L. S. (2013) Microsatellite-primed PCR and random primer amplification polymorphic DNA for the identification and epidemiology of dermatophytes. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 32(8):1009-1015.
- Stephens C. J. M., Hay R. J., Black M. M. (1989) Fungal kerion – total scalp involvement due to *Microsporum canis* infection. *Clinical and Experimental Dermatology*, 14:442-444.
- Stoitzner P., Romani N., McLellan A. D., Tripp C. H., Ebner S. (2010) Chapter 16: Isolation of skin dendritic cells from mouse and man. S.H. Naik (ed.), *Dendritic Cell Protocols*, Methods in Molecular Biology.
- Szepes E., Magyarlaki M., Battyáni Z., Schneider I. (1993) Immunohistological characterization of the cellular infiltrate in dermatophytosis. *Mycoses*, 36:203-206.
- Takahashi T., Gallo R. L. (2017) The critical and multifunctional roles of antimicrobial peptides in dermatology. *Dermatological Clinics*, 35:39-50.
- Takashima A., Matsue H. (2001) Chapter 12: Development and testing of dendritic cell lines. p. 165-177. En: Lotze M. T., Thomson A. W. *Dendritic Cells: Biology and Clinical Application*. Academic Press, 2001.
- Tani K., Adachi M., Nakamura Y., Kano R., Makimura K., Hasegawa A., Kanda N., Watanabe S. (2007) The effect of dermatophytes on cytokine production by human keratinocytes. *Archives in Dermatology Research*, 299:381–387.
- Taniwaki M.H., Pitt J.I., Hocking A.D., Fleet G.H. (2006) Comparison of hyphal length, ergosterol, mycelium dry weight, and colony diameter for quantifying growth of fungi from foods. In: Hocking A.D., Pitt J.I., Samson R.A., Thrane U. (Eds) *Advances in Food Mycology*. Advances in Experimental Medicine and Biology, Vol 571. Springer, Boston, MA.
- Taylor P. R., Tsoni S. V., Willment J. A., Dennehy K. M., Rosas M., Findon H., Haynes K., Steele C., Botto M., Gordon S., Brown G. D. (2006) Dectin-1 is required for β -glucan recognition and control of fungal infection. *Nature Immunology*, 8(1):31-38.

Telechea A., López F., Grilli D., Degarbo S., Arenas G. (2011) Agentes de onicomycosis de manos y pies. XII Congreso Argentino de Micología – XXII Jornadas Argentinas de Micología.

Timares L., Takashima A., Johnston S. A. (1998) Quantitative analysis of the immunopotency of genetically transfected dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95:13147-13152.

Tirado-González M., Ball E., Ruiz A., Rodriguez Y., Goudet C. E., Finkel O., Golan H., Martinez de Morentin H., Sprecher H., Sprecher E., Gat A. (2012) Disseminated dermatophytic pseudomycetoma caused by *Microsporum* species. *International Journal of Dermatology*, 51:1478-1482.

Tőke E. R., Lőrincz O., Csiszovszki Z., Somogyi E., Felföldi G., Molnár L., Szipőcs R., Kolonics A., Malissen B., Lori F., Trocio J., Bakare N., Horkay F., Romani N., Tripp C. H., Stoitzner P., Lisziewicz J. (2014) Exploitation of Langerhans cells for in vivo DNA vaccine delivery into the lymph nodes. *Gene Therapy*, 21:566-574.

Tomalka J., Azodi E., Narra H. P., Patel K., O'Neill S., Cardwell C., Hall B. A., Wilson J. M., Hise A. G. (2015) β -Defensin 1 plays a role in acute mucosal defense against *Candida albicans*. *The Journal of Immunology*, 194:1788-1795.

Tosello Boari J., Amezcua Vesely M. C., Bermejo D.A, Ramello M. C., Montes C. L., Cejas H., Gruppi A., Acosta Rodríguez E. V. (2012) IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. *PLoS Pathogens*, (4):e1002658.

Trautwein-Weidner K., Gladiator A., Nur S., Diethelm P., LeibundGut-Landmann S. (2015) IL-17-mediated antifungal defense in the oral mucosa is independent of neutrophils. *Mucosal Immunology*, 8(2):221-231.

van den Berg W. B., McInnes I. B. (2013) Th17 cells and IL-17A – Focus on immunopathogenesis and immunotherapeutics. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 43:158-170.

Veldhoen M. (2017) Interleukin 17 as a chief orchestrator of immunity. *Nature Immunology*, 18(6):612-621.

Vermout S. M., Brouta F. D., Descamps F. F., Losson B. J., Mignon B. R. (2004) Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a

Microsporum canis metalloprotease subunit vaccine in guinea pigs. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 40:75-80.

Vermout S., Baldo A., Tabart J., Losson B. Mignon B. (2008) Secreted dipeptidyl peptidases as potential virulence factor for *Microsporum canis*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 54:299-308.

Vermout S., Tabart J., Baldo A., Mathy A., Losson B., Mignon B. (2008a) Pathogenesis of dermatophytosis. *Mycopathologia*, 166:267-275.

Vokaer B., Charbonnier L-M, Philippe H. Lemaître P. H., Spilleboudt C., Le Moine A. (2013) IL-17A and IL-2-expanded regulatory T cells cooperate to inhibit Th1-mediated rejection of MHC-II disparate skin grafts. *PLoS ONE*, 8(10):e76040.

Weitzman I., Summerbell R. C. (1995) The dermatophytes. *Clinical Microbiology Reviews*, 8(2):240-259.

Whibley N., Jaycox J. R., Reid D., Garg A. V., Taylor J. A., Clancy C. J., Nguyen M. H., Biswas P. S., McGeachy M. J., Brown G. D., Gaffen S. L. (2015) Delinking CARD9 and IL-17: CARD9 protects against *Candida tropicalis* infection through a TNF- α -dependent, IL-17-independent mechanism. *The Journal of Immunology*. 195:3781-3792.

White T. C., Oliver B. G., Gräser I., Henn M. R. (2008) Generating and testing molecular hypothesis in the dermatophytes. *Eukaryotic Cell*, 7(8)1238-1245.

Young J. C. (1995) Microwave-assisted extraction of the fungal metabolite ergosterol and total fatty acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43:2904-2910.

Zahur M., Afroz A., Rashid U., Khaliq S. (2014) Dermatophytes: challenges and human immune responses. *Current Protein and Peptide Science*, 15: 437-444.

Zhan P., Liu W. (2017) The changing face of dermatophytic infections worldwide. *Mycopathologia*, 182:77-86.

Anexos

9.1. Publicaciones

9.1.1. Artículos publicados o en prensa

M. F. Spesso, C. T. Nuncira, **V. L. Burstein**, D. T. Masih, M. D. Dib y L. S. Chiapello. Microsatellite-primed PCR and random primer amplification polymorphic DNA for the identification and epidemiology of dermatophytes. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013, 32(8):1009-1015. DOI 10.1007/s10096-013-1839-3.

9.1.2. Artículos enviados a publicar

Burstein, V. L., Guasconi, L., Beccacece I., Theumer M. G., Mena C., Printz I., Cervi L., Herrero M., Masih D.T., Chiapello L.S. Interleukin-17 (IL-17)-mediated immunity controls skin infection and T helper 1 response during experimental *Microsporum canis* dermatophytosis.

9.2. Presentaciones en congresos

Becaccece I., **Burstein V. L.**, Guasconi L., Mena C., Gruppi A., Theumer MG, Cervi L., Chiapello L. *Interleukin 17-producing epidermal cell subsets in experimental Microsporum canis dermatophytosis*. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias SAIC- SAIB –SAI – SAA – SAB – SAB- SAFE – SAFIS – SAH – SAP. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, **2017**.

Burstein V.L., Guasconi L., Theumer M.G., Beccacece I., Mena C., Masih D.T., Chiapello L. *Las células de Langerhans inducen la respuesta Th17 en la infección cutánea experimental con Microsporum canis*. I Congreso Científico Profesional de Bioquímica. Universidad Nacional de Córdoba. Universidad Católica de Córdoba. Colegio de Bioquímicos de Córdoba. Federación de Bioquímicos de Córdoba. Bio Red S.A. Asociación de Bioquímicos de Córdoba. Centro Bioquímico Regional de Río Cuarto. Córdoba, Córdoba, Argentina, **2016**.

Burstein V. L., Guasconi L., Becaccece I., Theumer M.G., Herrero M., Mena C., Masih D., Chiapello L. *In vivo role of Langerhans cells and IL-17 immunity in experimental Microsporum canis infection*. LXI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. LXIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. XLVIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Farmacología experimental. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, **2016**.

Burstein V.L., Theumer MG, Guasconi L., Mena C., Herrero M, Masih D.T., Chiapello L. S. *Skin immunity: IL-17 protects against epidermal dermatophytic infection and regulates the exacerbated inflammatory antifungal response*. IV LASID Meeting – LXIII Argentinean Immunology Society Meeting – II French Society for Immunology Meeting. Sociedad Latinoamericana de Inmunodeficiencias – Sociedad Argentina de Inmunología. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, **2015**.

Burstein V.L., Theumer MG, Guasconi L., Mena C., Herrero M, Masih D.T., Chiapello L. S. *The dual role of T helper 17 - mediated immune response during experimental dermatophytosis*. INFOCUS 2015 – Infecciones fúngicas en la práctica clínica. Círculo Médico de Córdoba. Córdoba, Córdoba, Argentina, **2015**.

Burstein V. L., Masih D. T., Chiapello L *La dermatofitosis experimental con Microsporum canis induce una respuesta Th17*. LIX Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación clínica. LXII Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, **2014**.

Burstein V., Masih D., Chiapello L. *Dermatofitosis experimental: modelo de infección murina con M. canis*. XIII Congreso Argentino de Micología. Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina, **2014**.

Burstein V. L., Masih D. T., Chiapello L. *Immunomodulatory effects of M. canis on murine epidermal cells*. LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Los Cocos, Córdoba, Argentina, **2013**.

Burstein V. L., Masih D. T., Chiapello L. *Efectos de hongos dermatofitos sobre la activación de células de Langerhans murinas XS106*. LVII Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina, **2012**.

9.3. Premios

INFOCUS 2015 – Infecciones fúngicas en la práctica clínica. Tercer premio: **Burstein V.L.**, Theumer MG, Guasconi L., Mena C., Herrero M, Masih D.T., Chiapello L. S. *The dual role of T helper 17 - mediated immune response during experimental dermatophytosis*. Córdoba, **2015**.